

**Das Tyronase-System bei Calliphora
und seine Beeinflussung durch das Ecdyson**

Anton Schweiger

1900

Das Tyrosinase-System bei Calliphora
und seine Beeinflussung durch das Ecdyson

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Anton S c h w e i g e r
aus
Weilheim/Obb.

Mai 1960



1. Berichterstatter: Prof. Butenandt

2. Berichterstatter: Prof. Autrum

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1960

27.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Dozent Dr. Peter Karlson in der Zeit vom November 1957 bis Oktober 1959 am Max-Planck-Institut für Biochemie und am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität in München ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt, danke ich herzlich für die stets wohlwollende und großzügige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dozent Dr. Peter Karlson bin ich für wertvolle Anregungen und Ratschläge zu nicht weniger herzlichem Dank verbunden.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

G l i e d e r u n g

	Seite
A Einleitung	5
Ziel der Arbeit	8
B Allgemeiner Teil	
I. Zur Biochemie des Tyrosinase-Systems bei Calliphora	9
1. Die Aktivierung der Protyrosinase	12
2. Die Komponenten des Systems	
a) die aktive Phenoloxydase	17
b) die Protyrosinase	21
c) der Aktivator	22
d) ein Inhibitor	22
e) ein Metallion als Cofaktor	24
II. Die Tyrosinase-Aktivierung im Verlauf der Normalentwicklung bei Calliphora . . .	25
1. Der Verlauf der Endaktivität	29
2. Der Verlauf der rez. Halbakt. Zeit. . . .	32
III. Experimentelle Beeinflussung des Tyrosinase-Systems bei Calliphora	
1. Ausschaltung der Hormondrüsen	35
2. Injektionsversuche	44
IV. Diskussion	50
C Versuchsteil	53
D Zusammenfassung	65
Literaturverzeichnis	66

E I N L E I T U N G

Als Hormone wurden die Wirkstoffe bezeichnet, die von den innersekretorischen Drüsen des Organismus gebildet werden, mit dem Blutstrom an das Erfolgsorgan gelangen und dort eine bestimmte charakteristische Wirkung auslösen. Seit dieser von STARLING und anderen um 1905 gegebenen Definition sind zahlreiche Hormone isoliert und in ihrer chemischen Konstitution aufgeklärt worden. Ihre physiologischen Wirkungen wurden genau untersucht, aber die Frage nach dem eigentlichen Wirkungsmechanismus ist noch weitgehend ungelöst.

Als chemischer Stoff muß ein Hormon in die chemischen Vorgänge der Zellen und Gewebe eingreifen. Man kennt heute zahlreiche Beispiele für eine endokrine Regulation wichtiger enzymatischer Reaktionen. Hormone scheinen allerdings zumeist nur auf intakte Zellen, nicht auf biochemische Systeme zu wirken. Physiologisch bedeutungsvolle Effekte wurden bisher durchwegs in vivo oder mit ganzen Zellen in vitro erzielt. In letzter Zeit wurden einige Vorstellungen entwickelt, auf welche Weise Hormone ihre Funktion ausüben könnten (Zusammenfassungen von HECHTER ¹⁾, MUELLER ²⁾).

1. Hormone ändern die Zusammensetzung der Gewebsenzyme. So wird z.B. die Leberphosphorylase b unter der Wirkung von Adrenalin und Glukagon in die Phosphorylase a überführt.
2. Sie hemmen oder beschleunigen Enzymreaktionen an sich. Ein Beispiel ist die komplettierende Wirkung des Oestradiols im TPN, DPN, Isocitrat System.
3. Sie greifen in Enzymsysteme indirekt über Aktivatoren oder Inhibitoren ein. (Hierfür sind allerdings keine Beispiele bekannt.)
4. Sie beeinflussen die Permeabilität der Zellmembran und der Membranen intrazellulärer Partikel (Mitochon-

drien und Mikrosomen) und vermögen dadurch den Transfer für den Stoffwechsel wichtiger Substanzen zu kontrollieren (z.B. Kontrolle des "Zucker-Transfer-Mechanismus" durch das Insulin).

In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Wirkungsweise des Insektenhormons Ecdyson erbracht werden.

Die physiologische Wirkung dieses Hormons konnte von FRÄNKEL³⁾, BECKER⁴⁾, VOGT⁵⁾, POSSOMPES⁶⁾, KARLSON^{7,8)} u.a. geklärt werden. Es löst bei erwachsenen Fliegenlarven (z.B. Calliphora) eine charakteristische Reaktion aus, die Puparienbildung (Puparisierungs- oder Verpuppungshormon); die letzte Larvencuticula wird puparisiert, d.h. sie erfährt eine Verhärtung und Dunkelfärbung. Diese Reaktion liegt dem Calliphora-Test zugrunde, der bei der Isolierung des ersten Insektenhormons, eben des Ecdysons durch BUTENANDT u. KARLSON (1954)⁹⁾ wegleitend war.

Die Puparienbildung ist eine vom Ecdyson kontrollierte biologische Reaktion. Ihr Chemismus wurde von PRYOR¹⁰⁾, FRÄNKEL¹¹⁾, DENNELL¹²⁾, HACKMAN¹³⁾ u.a. eingehend untersucht. Das Puppentönnchen ist (wie das Außenskelett der Insektenimago und der Crustaceen-Panzer) aus Chitin, einem polymeren N-acetyl-Glucosamin, und aus Proteinen aufgebaut; seine Festigkeit erhält es jedoch erst durch das Sklerotin, ein durch Chinone verändertes Protein. Die Bildung des Sklerotins geht auf die Aktivität von Phenoloxidasen zurück. Es wird angenommen, daß ähnlich wie bei der Melaninbildung (siehe I. Hauptteil) aus phenolischen Substanzen (Tyrosin) auf enzymatischem Wege Chinone entstehen, die mit den Proteinen der unverhärteten Cuticula nach Art einer Chinon-gerbung reagieren. Dabei werden nebeneinanderliegende Peptidketten vernetzt und es entsteht in Verbindung mit dem Chitin die harte "sklerotisierte" Cuticula (siehe Abb. 1).

Der Tyrosinase kommt somit im Puparisierungsgeschehen eine wichtige Aufgabe zu.

Da die chemischen Vorgänge der Sklerotisierung in der Insektenlarve durch das Ecdyson ausgelöst werden, war zwischen dem System Tyrosin-Tyrosinase einerseits und dem Hormon andererseits eine Beziehung zu vermuten.

Das Enzym liegt bei *Drosophila* nach HOROWITZ u. FLING¹⁴⁾ als inaktive Protyrosinase vor, die in vitro durch ein Aktivatorenzym in die aktive Tyrosinase übergeführt werden kann (vergl. BODINE¹⁵⁾, OHNISHI¹⁶⁾).

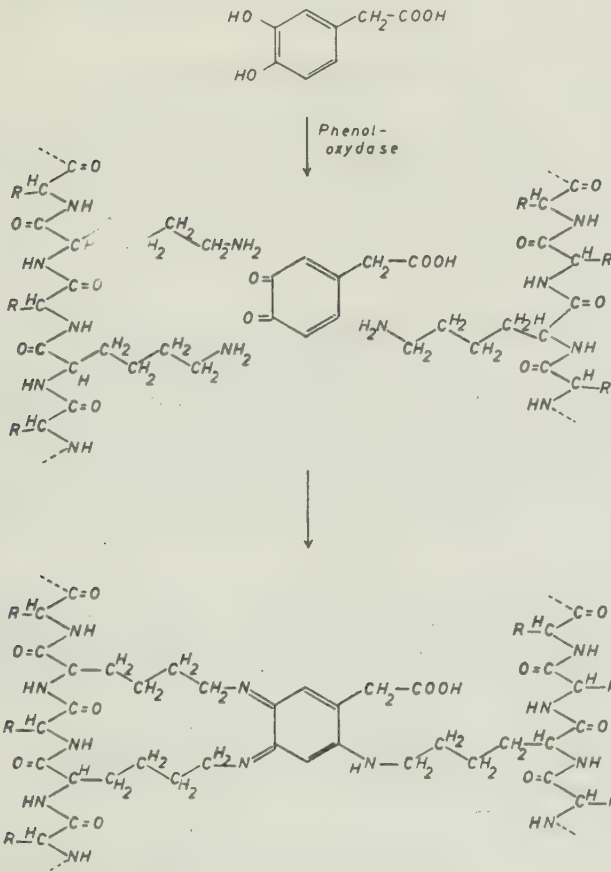


Abb. 1: Schema der Sklerotisierung.

Für das Eingreifen des Hormons waren grundsätzlich zwei Möglichkeiten denkbar:

1. Eine Enthemmung des Systems aktives Ferment-Substrat (der oben bei 2. genannte Mechanismus).

Diese Möglichkeit war vor einer genaueren Kenntnis des inaktiven Proenzym, wie wir sie vor allem HOROWITZ u. FLING verdanken, bereits diskutiert worden (DENNELL¹⁷).

KARLSON u. SCHMID¹⁸) konnten in vitro keine Aktivierung feststellen und damit diese Hypothese unwahrscheinlich machen.

2. Eine Aktivierung des inaktiven Proferments.

Diese Möglichkeit, die sich aus den Befunden von HOROWITZ u. FLING ergab, würde zu denselben Komponenten führen wie unter 1., weil dadurch aus einer Fermentvorstufe das aktive Ferment entstehen könnte.

ZIEL DER ARBEIT:

Die zuletzt unter 2. genannte Möglichkeit einer Aktivierung des Protyrosinase-Aktivator-Systems durch das Hormon sollte in dieser Dissertation geprüft werden. Dazu war zunächst zu klären, ob auch bei Calliphora das von HOROWITZ u. FLING gefundene Protyrosinase-System vorliegt; die Eigenschaften des Systems mußten zumindest soweit bekannt sein, daß vergleichende Versuche zwischen einzelnen Entwicklungsstadien möglich sind.

Mit der erarbeiteten Methode sollte dann die Enzymaktivität im Verlauf der Normalentwicklung und unter experimentellen Bedingungen (Drüsenexstirpation) verfolgt werden. Die Arbeit gliedert sich deshalb in 3 Teile:

1. Zur Biochemie der Tyrosinase bei Calliphora.
2. Die Tyrosinase-Aktivierung im Verlauf der Normalentwicklung.
3. Beeinflussung der Tyrosinase-Aktivierung durch Ausschaltung der Ringdrüse und durch Hormoninjektion.

Wie noch im einzelnen zu zeigen sein wird, vermag das Ecdyson eine Aktivierung des Prottyrosinase-Systems in vivo herbeizuführen. Es steigert die Wirksamkeit eines Aktivatorenzym, welches die Prottyrosinase in die Tyrosinase überführt und dadurch die Ferment-Substrat-Reaktion ermöglicht.

A L L G E M E I N E R T E I L

I. Zur Biochemie des Tyrosinase-Systems bei Calliphora:

Unsere Kenntnis der Tyrosinasen reicht ziemlich weit zurück. Als erste fanden BERTRAND u. BOURQUELOT (1895)¹⁹⁾ in Extrakten von Champignons ein Enzym, das die Oxydation von Tyrosin zu schwarzen Pigmenten katalysiert. Sie nannten dieses Enzym Tyrosinase; es gehört zur Gruppe der Phenoloxydasen. Die klassischen Arbeiten von RAPER²⁰⁾, KUBOWITZ²¹⁾, DAWSON²²⁾, KEILIN u. MANN²³⁾, MASON²⁴⁾, KERTESZ²⁵⁾ u.a. befaßten sich mit Eigenschaften und Wirkung der Phenoloxydasen.

Allen Phenoloxydasen gemeinsam ist die Fähigkeit, die Umwandlung einfacher phenolischer Substanzen in kompliziert gebaute Pigmente, die Melanine zu katalysieren. Folgendes Reaktionsschema wird heute allgemein anerkannt:

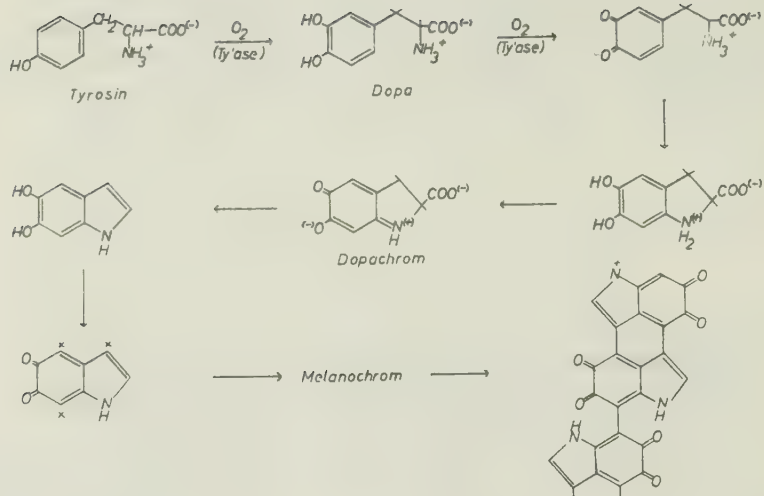


Abb. 2: Schema der Melaninbildung.

Die Aufklärung der Polymerisation des von RAPER gefundenen Dihydroxy-Indols verdanken wir vor allem englischen Autoren (HARLEY-MASON²⁶), BU'LOCK²⁷), CROMARTIE u.a.).

Es ist damit zu rechnen, daß bei der Sklerotisierung ein modifiziertes Schema durchlaufen wird, wobei nicht Indolchinone, sondern o-Benzochinone entstehen. Für die Zusammenhänge zwischen Hormon und Tyrosinase ist das zunächst von sekundärer Bedeutung.

Die in Abb. 2 gegebene Reaktionsfolge liegt dem enzymatischen Test zugrunde (siehe experimenteller Teil).

Homogenate von Pflanzen, die reich an Phenoloxydasen sind, wirken häufig sehr schnell auf native Substrate ein unter Bildung schwarzer Pigmente, während diese Reaktion im in-

takten Gewebe nicht stattfindet. Bei Insekten trifft man ähnliche Verhältnisse an. Die Tiere weisen zu gewissen Zeiten (kurz vor der Verpuppung) beträchtliche Mengen phenolischer Substanzen (Calliphora: 7,1 mg Tyrosin / g Frischgewicht nach FRÄNKEL) und eine Tyrosinase hoher Aktivität auf, ohne daß die beiden Komponenten miteinander reagieren. Die Ferment-Substrat-Reaktion ist in vivo gehemmt, sie tritt erst nach Zerstörung der Gewebe ein.

Eine Reihe von Autoren suchte diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären. GRAUBARD²⁸⁾, DENNELL¹⁷⁾, KARLSON u. WECKER²⁹⁾ nahmen spezifische Mechanismen an, welche die Melaninbildung verhindern, obwohl die Tyrosinase mit ihrem Substrat reagiert. BODINE¹⁵⁾ erkannte, daß das Ferment in einer inaktiven Vorstufe auftreten kann (Melanoplus, Tenebrio), die er Protyrosinase nannte. HOROWITZ u. FLING¹⁴⁾ beobachteten bei Drosophila einen Zusammenhang zwischen dem Proferment und einem spezifischen Aktivator in vitro (vergl. auch OHNISHI¹⁶⁾).

Sie fanden, daß frische Pufferextrakte aus Drosophila-Imagines zunächst enzymatisch unwirksam sind. Die Oxydase-Aktivität tritt erst allmählich auf. Die Kinetik der Aktivierung geht aus Abb. 3 hervor.

Auf Grund der Kinetik nehmen die Autoren an, daß die Aktivierung über einen bimolekularen autokatalytischen Prozess erfolgt. Eine Vorstufe des Enzyms wird durch ein aktivierendes Prinzip in das aktive Enzym umgewandelt. Der Aktivator ist nicht mit der Tyrosinase identisch, sondern ein abtrennbarer eigener Faktor, der Eiweißnatur besitzt. Der Spezialfall einer reinen Autokatalyse des Typs Trypsin-Trypsinogen konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Autoren schlagen vor, die aktive Tyrosinase als Produkt eines autokatalytischen Vorganges zu betrachten, an dem sie nicht teilnimmt, nach dem Modell:

Precursor + Aktivator ----- Tyrosinase + 2 Aktivator

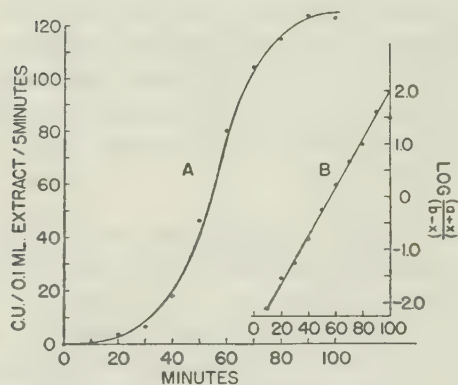


Abb. 3:
Aktivierungskurve
nach HOROWITZ u.
FLING (*Drosophila*)

1. Die Aktivierung der Protyrosinase bei Calliphora:

In den eigenen Versuchen wurde zuerst geprüft, ob das von HOROWITZ u. FLING an *Drosophila* gefundene Protyrosinase-Aktivator-System auch bei *Calliphora* vorliegt, und ob es darüber hinaus bei anderen Insektenordnungen verbreitet ist. Gleichzeitig sollte eine Ausgangsbasis für die weiteren Untersuchungen an *Calliphora* geschaffen werden:

Weiße Vorpuppen von *Calliphora erythrocephala* wurden mit Phosphat-Puffer extrahiert. Die Tyrosinase-Aktivität des Extrakts wurde in kurzen Abständen kolorimetrisch gemessen (Aufarbeitung und Messung siehe Versuchsteil).

Ergebnisse:

Frischer Extrakt ist ohne Phenoloxydase-Aktivität. Er enthält zunächst offensichtlich Komponenten, die den in vivo vorliegenden entsprechen: Ein nicht aktives Enzym und native Substrate. Es tritt keine Reaktion ein; der Extrakt bleibt in dieser "lag"-Periode völlig farblos. Allmählich findet eine Aktivierung des Profermentes statt. Es können

zuerst kleine und dann rasch ansteigende Tyrosinase-Aktivitäten gefunden werden. Der Extrakt färbt sich rosa, dann intensiv rot und schließlich schwarz (Melanin).

Für den Aktivierungsverlauf läßt sich eine Aktivierungskurve aufstellen (siehe Versuchsteil).

Die bei weißen Vorpuppen von *Calliphora* gefundenen Aktivierungskurven weisen stets die typisch sigmoide Form auf, wie sie HOROWITZ u. FLING unter vergleichbaren Bedingungen an *Drosophila* fanden.

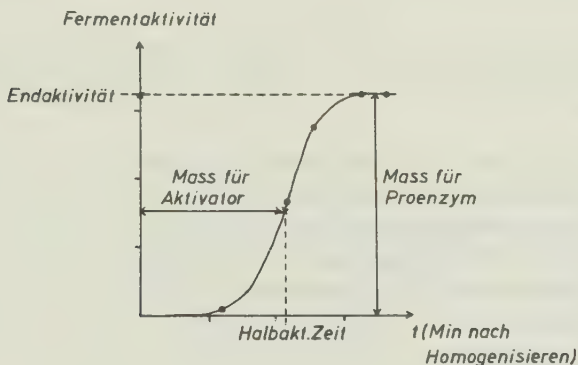


Abb. 4: Aktivierungskurve bei *Calliphora*.

In Abb. 4 ist auf der Ordinate eine maximale, nach der Aktivierung erreichte Fermentaktivität aufgetragen, die Endaktivität. Die Werte der Ordinate stellen somit ein Maß für die Menge an Proenzym, d.h. für die potentielle Tyrosinase-Aktivität *in vivo* dar.

Der Extrakt ist nach einer gewissen Zeit voll aktiviert; diese Aktivierungszeit ist jedoch nicht exakt zu ermitteln, da die Endaktivität asymptotisch erreicht wird. Es erwies sich als günstig, mit der Halbaktivierungszeit zu operieren,

d.h. mit der Zeit, bei der die Hälfte des Proenzymys aktiviert ist. Sie kann genau bestimmt werden: Man trägt den Halbwert der erreichten Endaktivität in die Aktivierungskurve ein und erhält einen Punkt (in der Nähe des Wendepunkts der Kurve), der bei Projektion auf die Abszisse die gesuchte Halbaktivierungszeit angibt.

Die Werte der Halbaktivierungszeit auf der Abszisse stellen somit ein Maß für die Wirksamkeit des Aktivator-Enzyms dar, das wir kurz Aktivator nennen wollen. Je kürzer die Halbaktivierungszeit, um so höher ist dessen enzymatische Aktivität.

Im folgenden wird die Halbaktivierungszeit analog zur THUNBERG-Methode³⁰⁾ meist als reziproke Halbaktivierungszeit angegeben.

Übereinstimmend mit Befunden von HOROWITZ u. FLING erwies sich die Aktivierung in Extrakten von Calliphora als stark konzentrationsabhängig. Weitgehende Verdünnung vermag die Aktivierung praktisch zu verhindern, obwohl Proenzym und Aktivator nebeneinander vorliegen (vergl. Abb. 5).

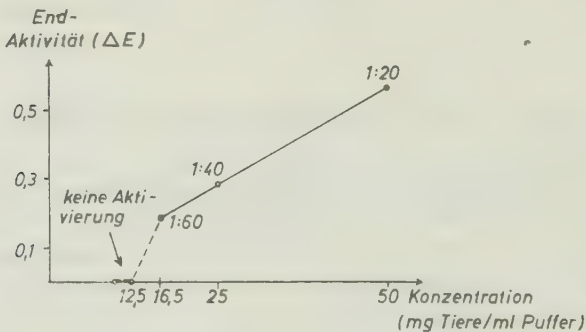


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung

Der Aktivierungsvorgang zeigt ein ausgeprägtes pH-Optimum bei pH 6,0 (Abb. 6).

Unter pH 5,0 und über pH 8,0 tritt eine vollständige Hemmung der Aktivierung ein. Sie scheint im sauren Bereich bis etwa pH 4,0 herab reversibel zu sein; denn es ist möglich, durch pH-Verschiebung in Richtung des Optimums nachträglich eine Aktivierung zu erreichen.

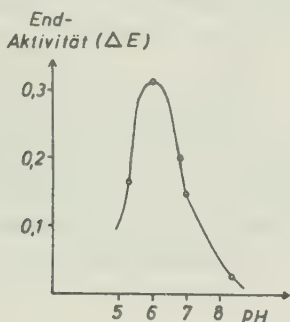


Abb. 6:
pH-Abhängigkeit der Aktivierung.

Die Ergebnisse über den tyrosinase-aktivierenden Prozess bei Calliphora-Larven stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden bei Drosophila. Kleine Unterschiede sind vermutlich zum Teil auf die unterschiedliche Entwicklungsstufe des Materials zurückzuführen (HOROWITZ u. FLING verwendeten 6 Stunden alte Fliegen, also Imagines; bei Calliphora wurden Larven und weiße Vorpuppen untersucht).

Auf Grund des Vergleichs könnte man annehmen, daß der ziemlich ungewöhnliche und durch das Zusammenwirken einer ganzen Reihe von Faktoren gesteuerte Prozess der Tyrosinase-Aktivierung bei einigen Familien der cyclorrhaphen Dipteren eine gewisse Verbreitung besitzt. Es scheint allerdings große quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern zu geben. Bei Drosophila und besonders bei Calliphora liegen offensichtlich optimale Bedingungen zur Untersuchung des Aktivierungsphänomens vor. Doch schon Extrakte aus Larven der mit Calliphora nahe verwandten Fleischfliege Sarcophaga aktivieren bei relativ hoher Homogenat-Konzentration äußerst langsam zu niedrigen Endaktivitäten (siehe

Versuchsteil Tab. 3). Vielleicht ist es dieses vergleichsweise stark ausgeprägte System der Tyrosinase-Aktivierung, das gerade *Calliphora*-Larven für den Ecdyson-Test so überaus empfindlich macht.

Außer den beiden Vertretern der Dipteren wurde je ein Vertreter der Saltatoria (*Schistocerca*), der Coleoptera (*Tenebrio*) und der Lepidoptera (*Vanessa urticae*) untersucht.

Alle diese Tiere wie auch schon *Sarcophaga* zeigten bei Konzentrationen von 1:40, der *Calliphora*-Standardkonzentration (siehe Versuchsteil), überhaupt keine Aktivierung. Der 1:20 Extrakt einer Raupe von *Vanessa* etwa 2 Tage vor der Verpuppung aktivierte zu relativ niedriger Aktivität (Abb. 7).

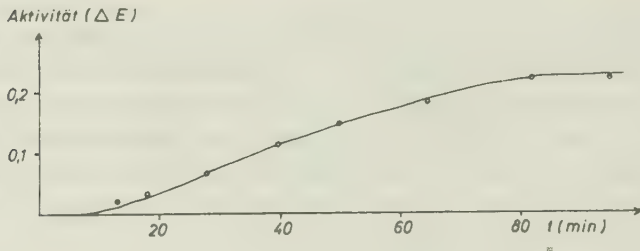


Abb. 7: Aktivierung eines Extraktes von *Vanessa*.

Extrakte von *Tenebrio* (Larven und Puppen) zeigten überraschenderweise auch bei Konzentrationen von 1:20 nur äußerst geringe oder überhaupt keine Aktivierung. Ebenso blieben Extrakte von *Schistocerca* ohne Aktivität. Es wurden hierbei Tiere von *Schistocerca* in der Wildform und ein Albinostamm verwendet, der zu der Zeit in unserem Institut gezüchtet wurde. Worauf dieser scheinbare Mangel an Tyrosinase beruht, konnte nicht gefunden werden. Wahrscheinlich unterscheiden sich die Aktivierungsbedingungen bei diesen Tieren von denen bei *Calliphora*.

Ein Vergleich zwischen Insekten-Tyrosinase und Phenoloxydase pflanzlicher Herkunft ergab folgende Unterschiede:

- a) Die Aktivität der untersuchten pflanzlichen Phenoloxydasen (bezogen auf mg extrahiertes Gewebe) lag beträchtlich unter den bei weißen Vorpuppen von *Calliphora* gefundenen Werten (vergl. Tab. 3, Versuchsteil).
- b) Pflanzliche Phenoloxydasen können in aktivem Zustand extrahiert werden. Eine Hemmung der Ferment-Substrat-Reaktion im intakten Gewebe wird durch einen anderen Mechanismus erreicht wie bei *Calliphora* (lokale Trennung der Komponenten, Sauerstoffausschluß).
- c) Tyrosinase aus Kartoffel und Champignon ist offensichtlich echt löslich im Gegensatz zur partikelgebundenen *Calliphora*-Tyrosinase.

2. Die Komponenten des Systems:

Für die Themenstellung der Arbeit war eine Kenntnis der Komponenten des Tyrosinase-Systems wünschenswert. In der Literatur fanden sich dazu nur kurze Hinweise. In eigenen Versuchen sollten die Eigenschaften des aktiven Enzyms, des Proenzym und des Aktivators wenigstens soweit untersucht werden, wie es zur Kennzeichnung der Homogenate nötig war.

a) Die aktive Phenoloxydase:

Insektentyrosinasen wurden verschiedentlich untersucht mit dem Ziel sie zu reinigen. Dabei konnten jedoch stärkere Anreicherungen nie erzielt werden. KARLSON u. SCHMID¹⁸⁾ halten es auf Grund neuerer Arbeiten über die Tyrosinase der *Calliphora*-Larven für möglich, daß "eine Bindung an Partikel von Mikrosomengröße für die tierischen Tyrosinasen typisch ist" (vergl. LERNER u. Mitarb.³¹⁾, WARD u. Mitarb.³²⁾).

Während KARLSON u. SCHMID bei ihren Versuchen von Azetontrockenpulver ausgingen, interessierte im Zusammenhang mit dem Aktivierungsprozess das Verhalten des Enzyms in

frischen Homogenaten.

Zunächst wurde sein Verhalten in der Ultrazentrifuge untersucht (vergl. Tab. 1).

Tab. 1: Zentrifugation eines Extrakts aus weißen Vorpuppen von *Calliphora*. Konzentration 1:10, Phosphatpuffer 0,065 m, pH 6,0.

Zeit	Zentrifugalkraft	Aktivität Überstand	Aktivität Sediment	Art des Sediments
60 min	5 000 g	100 %	---	Debris
60 min	40 000 g	100 %	---	wenig Melanin
60 min	60 000 g	50 %	50 %	Melanin + Partikel
60 min	108 000 g	---	100 %	Melanin + Partikel

Bis zu 40 000 g wird auch bei 1-2 stündiger Zentrifugation praktisch kein Enzym abgeschleudert. Erst ab 50 000 g beginnt Tyrosinase-Aktivität ins Sediment zu wandern. (Zum Vergleich sei angeführt, daß Mikrosomen aus Leberhomogenaten, 0,25 m Sucrose, bei Zentrifugation von 1 Stunde bei 54 000 g abgeschleudert werden.) 1-stündige Zentrifugation bei etwa 100 000 g vermag aus *Calliphora*-Extrakten im Normalfall (Ausnahmen siehe unten) die Tyrosinase-Aktivität quantitativ abzuschleudern. Bei Homogenaten pflanzlichen Ursprungs (Champignon, Kartoffel) enthielten die 1-Stunden-Überstände (100 000 g) den größten Teil der Gesamtphenol-oxydase-Aktivität; diese Enzyme sind echt löslich.

Enzymaktivität im 1-Stunden-Überstand (100 000 g) kann somit wohl als Kriterium für wirkliche Löslichkeit einer Tyrosinase-Präparation angesehen werden.

Bei den folgenden Lösungsversuchen wurde deshalb auf Aktivität im Überstand geprüft. Die Fermentpräparationen wurden einigen Methoden unterworfen, mit denen bei Lösung

anderer Desmo-Enzyme bereits gute Erfolge erzielt worden waren. Die folgende Tabelle zeigt die Art des angewandten Verfahrens und seine Wirkung. Die angeführten Beispiele sind einige aus einer beträchtlichen Anzahl von Versuchen (vergl. Versuchsteil).

Tab. 2: Versuche zur Lösung aktiver Tyrosinase

Art des Angriffes	Ergebnis	Bemerkung
1. Lipidlösungsmittel zur Dissoziation eines Lipoproteids durch		
a) n-Butanol bis 15 %	Akt. im Sediment	
b) Äther bis 10 %	keine Aktivität	denaturierend
c) 0,1 Sätt. mit Ammonsulfat + 1 vol Azeton	keine Aktivität	stark denatur. andere Konzentrat. ohne Wirkung
2. Zerstörung von Ionenkomplexen mit Äthylen-diamin-tetraacetat 0,5%	Akt. im Sediment	verringerte Opaleszenz des Extrakts
3. Sprengung von Wasserstoffbrücken mit Harnstoff bis 4 m	Akt. im Sediment	erforderliche hohe Konzentration denaturierend
4. pH-Veränderung zwischen pH 5,0 - 9,0	Akt. im Sediment	

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Resistenz der angenommenen Ferment-Partikel-Bindung sehr groß ist. Die Bemühungen führten nicht über eine von KARLSON u. SCHMID erzielte Anreicherung des Fermentes hinaus.

Normalerweise wird also die gesamte Enzymaktivität bei 100 000 g mit der Mikrosomenfraktion abgeschleudert. Überraschenderweise konnte jedoch in wenigen, nicht reproduzierbaren Fällen beträchtliche Aktivität, bis 0,5 Photometer-Einheiten, d.h. etwa 50 % der ursprünglichen Fermentaktivität im 1-Stunden-Überstand (100 000 g) gefunden werden. Es mußte sich dabei um echt gelöstes Ferment gehandelt haben. Der Effekt trat sowohl bei Extrakten mit aqua dest. und Phosphatpuffer pH 6,0 auf. Bedingung war anscheinend sofortiges Zentrifugieren nach dem Homogenisieren bei hohen Zentrifugalbeschleunigungen (100 000 g) in der Ultrazentrifuge.

Bei den beschriebenen Versuchen mit der aktiven Tyrosinase wurde angenommen, daß das Ferment an Partikel von Mikrosomengröße gebunden und deshalb nur pseudolöslich ist. Eine andere Erklärung deutet HOROWITZ¹⁴⁾ an, wenn er berichtet, "das aktive Ferment zeigt während des Aktivierungsvorganges die Neigung zu aggregieren". (Das Aggregat konnte bei 40 000 g abgeschleudert werden.) Man könnte somit annehmen, daß eine unlösliche Tyrosinase aus einer echt löslichen Tyrosinase erst sekundär in vitro hervorgeht. Es würde sich dann bei den Partikeln, mit denen die Enzymaktivität ins Sediment wandert, nicht um natürliche Zellstrukturelemente handeln, sondern um nachträglich entstandene Komplexe hohen Molekulargewichts. Es konnte nicht entschieden werden, ob bei Calliphora eine ähnliche Aggregation der Tyrosinase stattfindet. Versuche mit dem Proenzym (siehe unten) lassen eher vermuten, daß dieses bereits unlöslich ist, sei es nun durch Aggregation oder Partikelbindung. Andererseits sollte man annehmen, daß die angewandten Methoden zur Lösung geeignet wären, Aggregate dieser Art abzubauen.

Zum Vergleich wurde eine Tyrosinase des Seidenspinners *A. pernyi* untersucht (Puppen). Das Ferment, das bei diesen Tieren in der grünlich gefärbten und völlig klaren Hämolymphe vorliegt, blieb auch bei hohen Zentrifugalbeschleunigungen

nigungen (100 000 g) zum großen Teil im Überstand.

Neben den bisher erwähnten Phenoloxydasen, die in einer löslichen oder pseudolöslichen Form vorkommen, konnte in Cuticeln erwachsener Calliphora-Larven eine extrem unlösliche Tyrosinase gefunden werden. Man erhält sie, wenn man die von anhängendem Gewebe sorgfältig befreien und mehrmals mit Puffer gewaschenen Cuticeln möglichst fein verreibt (Potter-Elvehjem-Glashomogenisator). Sie ist fest an die Cuticelsubstanz gebunden und wird mit dieser schon bei etwa 5 000 g abgeschleudert. Die Aktivität dieser Fraktion beträgt ca. 5 % der Gesamtaktivität.

b) Das Proferment:

Im Anschluß an die Arbeiten mit aktiver Tyrosinase wurden Versuche durchgeführt, welche die Löslichkeit des Profermentes klären sollten:

Bei entsprechend niedriger Homogenatkonzentration (etwa 1:50) oder durch Zusatz von 10-20 % Azeton zu Extrakten höherer Konzentration läßt sich eine Verzögerung der Aktivierung um 1-2 Stunden erreichen. Man erhält so ein "Proenzym-Präparat", das 1 Stunde wie oben das aktive Ferment hochtourig (100 000 g) zentrifugiert werden kann. Der 1-Stunden-Überstand dieser Zentrifugation sollte das Proferment enthalten, sofern dieses echt löslich ist, und allmählich aktivieren. (Als Ersatz für evtl. abgeschleuderten Aktivator wurde 10 % niedrig zentrifugierter Extrakt der Konzentration 1:10 zugesetzt.)

In keinem der Fälle konnte jedoch eine Aktivierung des 1-Stunden-Überstandes gefunden werden. Dagegen aktivierte die abgeschleuderte und resuspendierte Partikelfraktion zu Fermentaktivitäten, die etwas niedriger lagen als ein Blindwert, der an einem gleichermaßen aufgearbeiteten jedoch nicht hochtourig zentrifugierten Extrakt gemessen wurde. Es ist anzunehmen, daß das Proferment wie das aktive Ferment nicht echt löslich ist. Es entspricht wohl in sei-

nen Lösungseigenschaften der aktiven Tyrosinase.

c) Der Aktivator:

Die unter b) beschriebenen Versuche (Aktivierung des abgeschleuderten Proenzym) zeigen, daß die sedimentierte Partikelfraktion auch Aktivator enthielt. Es kann jedoch nicht entschieden werden, ob die Aktivierung auf größere Mengen eines partikelgebundenen (mitabgeschleuderten) Aktivators oder spurenweise Verunreinigung eines löslichen Aktivators zurückzuführen ist.

Bei Drosophila findet sich "der Aktivator nach hochtourigem Zentrifugieren eines Homogenates im Überstand" (ZIEGLER-GÜNDER u. JAENICKE³³).

d) Ein Inhibitor:

In Homogenaten von Calliphora konnte eine hemmende Komponente gefunden werden, die sehr eng an die Debris-Fraktion gebunden ist. Sie läßt sich durch kurzes Zentrifugieren (5 min) in der Servall-Zentrifuge (bei etwa 25 000 g) ziemlich quantitativ vom Überstand abtrennen. Ausschlaggebend für die Wirkung des Inhibitors ist die Zeit, die zwischen Homogenisieren der Tiere und der Zentrifugation vergeht. Es ergaben sich Hinweise, daß in einer relativ schnell verlaufenden Reaktion das Proenzym aus dem Homogenat abgefangen wird (Abb. 8).

Zentrifugiert man 5 min nach Homogenisieren, so findet man sehr hohe Fermentaktivitäten im aktivierten Überstand, die dann wohl der in vivo vorliegenden Konzentration an Proenzym entsprechen. Vergeht jedoch eine Zeit von 10-15 min zwischen Homogenisieren und Zentrifugieren, so findet sich nur mehr ein geringer Teil der Aktivität im aktivierten Überstand. Diese Restaktivität des Überstandes bleibt dann ziemlich konstant, auch wenn das Homogenat erst nach 40 oder 60 min zentrifugiert wird. Über das Schicksal des Aktivators während des Vorganges konnte noch keine Klarheit erzielt werden. Weitere Arbeiten müssten zeigen, ob

diese Inhibition einer Anreicherung des Aktivators gleich-
kommt.

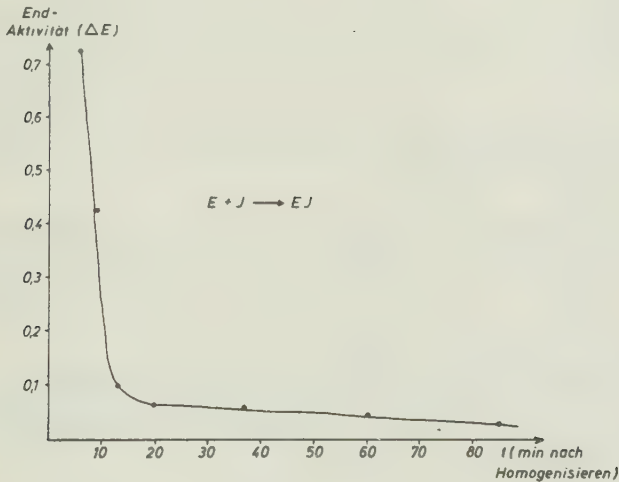


Abb. 8: Zeitlicher Verlauf der Inhibitorwirkung in
einem Homogenat von Calliphora-Larven
(Konzentration 1:10)

HOROWITZ u. FLING fanden in frischen Extrakten von Drosophila einen Faktor, der bei Zentrifugationsbeschleunigungen von 20 000 g im Überstand bleibt und aktive Tyrosinase reversibel hemmt (Abb. 9).

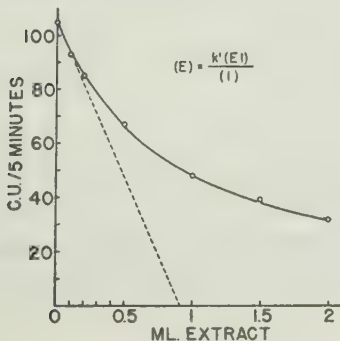


Abb. 9:
Reversible Hemmung aktiver
Tyrosinase bei Drosophila
(HOROWITZ u. FLING)

Die Kinetik der bei *Calliphora*-Homogenaten gefundenen Inhibition deutet dagegen auf einen irreversiblen Vorgang hin; ebenso wie die Tatsache, daß die verschwundene Fermentaktivität nicht mehr gefunden werden konnte. So sollte Resuspension der Debrisfraktion bei einer reversiblen Reaktion Proenzym aus dem Komplex freimachen. Im Überstand der Debris-Resuspension zeigte sich jedoch keine Aktivierung, obwohl Aktivator zugesetzt wurde (in Form von 20 % eben aktivierten Extrakts).

Die beschriebene Hemmung ist konzentrationsabhängig. Zentrifugiert man ein Homogenat, dessen Konzentration 1:10 beträgt, nach 40 min, so sind 75-80 % der Aktivität gehemmt. Bei einer Konzentration von 1:40 sind es nur 50-60 % (vergl. Abb. 10). Es bleibt also fast die gleiche Restaktivität bei Extrakten verschiedener Konzentration. Trotz eingehender Versuche konnte keine weitere Klärung dieses Befundes erreicht werden.

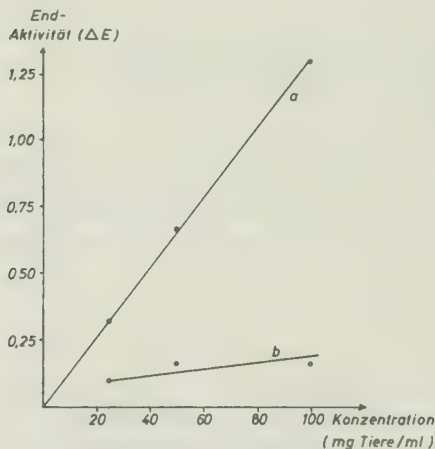


Abb. 10:
Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition
a Zentrif. nach 5 min
b Zentrif. nach 40 min

e) Ein Metallion als Cofaktor ? :

Versuche mit komplexbildenden Agentien brachten Hinweise, daß eine weitere Komponente, vermutlich ein Metallion, bei

der Aktivierung eine Rolle spielt. Zusatz von dem bekannten Komplexbildner Äthylen-diamin-tetraacetat (Komplexon, Versen) zum Homogenisierungsmedium (Endkonzentration 0,01 m) führte zu einer Hemmung der Aktivierung um etwa 60-80 %. Zusatz von Komplexon zu aktivem Ferment ist ohne Wirkung. Es kann sich somit kaum um einen Komplex mit dem Ferment-kupfer handeln.

ZIEGLER-GÜNDER u. JAENICKE³³⁾ beobachteten einen ähnlichen Effekt bei Homogenaten von Drosophila. Eine Hemmung der Aktivierung kann dort durch Zugabe eines Überschusses an Ca-Ionen rückgängig gemacht werden. (Privatmitteilung JAENICKE).

II. Die Tyrosinase-Aktivierung im Verlauf der Normalentwicklung bei Calliphora:

Die Versuche zur Biochemie des Tyrosinase-Systems hatten gezeigt, daß bei Calliphora eine Protyrosinase durch ein Aktivator-Enzym in die aktive Tyrosinase umgewandelt wird. In diesen Prozess konnte gemäß unseren Überlegungen (Seite 8) das Ecdyson aktivierend eingreifen.

Eine Wirkung des Hormones auf den Aktivierungs-Prozess wäre dann wahrscheinlich, wenn ein Zusammenhang zwischen Aktivierungsfähigkeit und Ecdysonkonzentration festzustellen ist. Wir haben deshalb das System Protyrosinase-Aktivator während der Postembryonal-Entwicklung eines Insekts untersucht, welche ja durch das Zusammenspiel wechselnder Konzentrationen von Puparisierungs- und Juvenil-Hormon gesteuert wird.

Aus den Untersuchungen von WIGGLESWORTH³⁴⁾, KÜHN³⁵⁾, PIEPHO³⁶⁾, WILLIAMS³⁷⁾ (Zusammenfassungen: KARLSON³⁸⁾, WIGGLESWORTH³⁹⁾) läßt sich für die Hormonphysiologie der zyklischen Prozesse von Häutung und Verpuppung folgendes Schema ableiten:

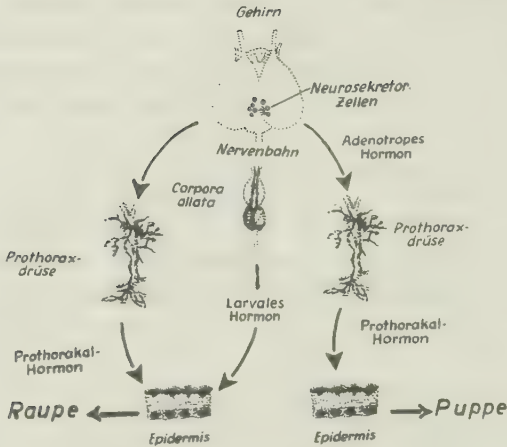


Abb. 11:
Schema der Hä-
tungsauslösung
(Lepidopteren)
nach KARLSON

Zu Beginn jeder Häutung stimuliert ein adenotropes Hormon des Insektengehirns die Prothorakaldrüsen, die darauf das Puparisierungshormon Ecdyson ausschütten. Die Corpora allata sezernieren das Juvenil-Hormon. Dieses prägt der Häutung larvalen Charakter auf, während das Ecdyson allein Puppenhäutung auslöst.

Im späten III. Larvenstadium kommen somit steigende Mengen des Ecdysons zur Wirkung; die letzte Phase der Postembryonalentwicklung, die Puparisierung, wird durch einen besonders hohen Gewebetiter dieses Hormones bestimmt.

In Abb. 12 ist der zeitliche Verlauf der Postembryonal-Entwicklung von *Calliphora erythrocephala* (Diptera, Holometabola) dargestellt:

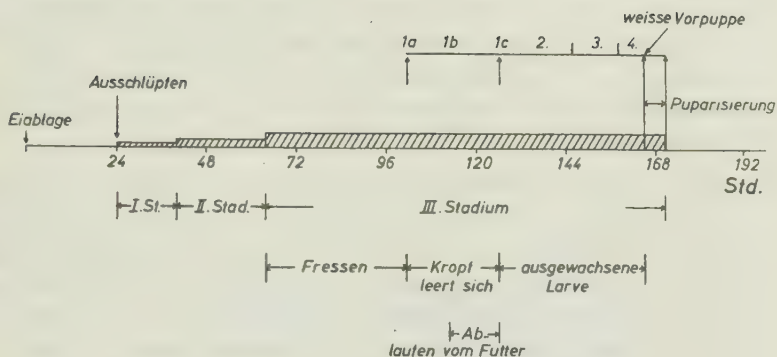


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Postembryonal-Entwicklung von *Calliphora erythrocephala*.

Die Postembryonal-Entwicklung wird durch 2 Larvenhäutungen unterteilt. Auf die zweite Häutung folgt das III. Larvenstadium, die Zeit größten Wachstums. Das Tier beendet seine obligate Fressperiode und zeigt eine auffallende Verhaltensänderung. Eine Periode unruhigen Umherkriechens endet mit Ausbildung der weißen Vorpuppen und des Pupa-riums. Die Cuticula wird sklerotisiert. Der Vorgang wird durch das Ecdyson ausgelöst.

Die Untersuchung des Tyrosinase-Systems im Verlauf der postembryonalen Entwicklung erforderte Methoden für:

1. eine sichere Altersbestimmung der Larven
 2. eine zuverlässige Bestimmung von Endaktivität und Halbaktivierungszeit (Aktivierungskurve).
1. Eine Altersbestimmung, die sich lediglich nach der Zeit der Aufzucht richtete, war wegen der biologischen Schwankungen der Entwicklung nicht möglich. Die Bestimmung nach

morphologischen Kriterien ist bei Fliegenlarven kaum anzuwenden, da diese Tiere während der ganzen Post-embryonal-Entwicklung acephal und extremitätenlos bleiben. Für eine differenzierte Unterteilung von Tieren des späten III. Larvenstadiums wurde ein von POSSOMPES⁶⁾ ausgearbeitetes Verfahren herangezogen, das auf charakteristischen Veränderungen des Kropfes beruht (siehe Versuchsteil).

2. Eine sichere indirekte Bestimmung von Proenzym- und Aktivator-Konzentration (durch Messen von Endaktivität und Halbaktivierungszeit) war mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden. Erst durch die in Teil I beschriebenen Vorarbeiten war es möglich, ein Verfahren der Aufarbeitung zu entwickeln, das reproduzierbare Werte für das Tyrosinase-System lieferte. Dazu mußten Standardbedingungen der Zeit, Temperatur und Konzentration eingehalten werden (siehe Versuchsteil).

Aus Vorversuchen ergab sich nun der überraschende Befund, daß Extrakte von Larven des I. und II. Stadiums in allen Fällen ohne meßbare Tyrosinase-Aktivität bleiben. Weder langes Stehenlassen (bis zu 24 Stunden), noch Zusatz von Aktivator (in Form von aktivem Extrakt) führte zu einer Aktivierung. Alle weiteren Untersuchungen konzentrierten sich demgemäß auf das III. Larvenstadium.

Das Tyrosinase-System wurde sowohl bei Larven untersucht, die etwa 24 Stunden vor Beendigung der Freßperiode vom Futter genommen worden waren, als auch bei Tieren, die eben spontan vom Futter abliefen (l_b und l_c nach POSSOMPES). Die letzteren konnten sich normal bei 25°C bis zur Puparisierung entwickeln; ihre Tyrosinase-Aktivität wurde in Abständen von 24 bzw. 3 Stunden (während des Verpuppungsvorganges) gemessen.

Ergebnisse:

Vergleicht man die gefundenen Aktivierungskurven (Abb. 13), so erkennt man, daß während des III. Larvenstadiums

die erreichbare Endaktivität allmählich ansteigt, während die Aktivierungszeiten sinken.

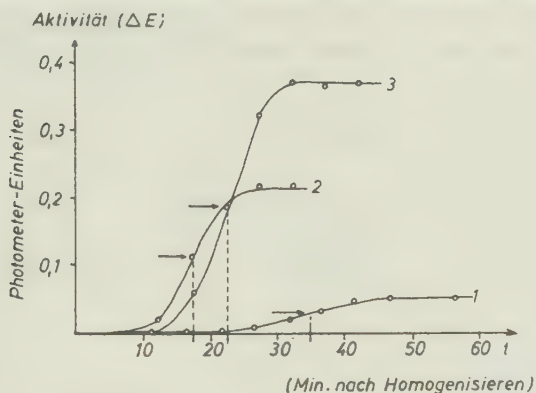


Abb. 13: Aktivierungskurven während des III. Larvenstadiums (*Calliphora*)
 1 Gruppe 1 nach POSSOMPES
 2 Gruppe 2
 3 weiße Vorpuppen

Die ersten geringen Fermentaktivitäten von 0,01 - 0,03 Photometereinheiten konnten etwa 24 Stunden vor spontaner Beendigung der Nahrungsaufnahme der Maden gefunden werden. Für den Zeitpunkt des Ablaufens (Kurve 1) ergeben sich langgestreckte und flache Aktivierungskurven; die Extrakte aktivieren erst spät zu niedrigen Endaktivitäten. Mit der Vorbereitung zur Verpuppung wird die Form der Aktivierungskurven ausgeprägter und steiler (Kurve 2 und 3).

1. Der Verlauf der Endaktivität ist in Abb. 14 dargestellt. Im Zeitpunkt des spontanen Ablaufens vom Futter weisen die Tiere in allen Fällen eine niedrige Fermentaktivität von etwa 0,05 Photometer-Einheiten auf. Nun folgt eine Periode relativ starker Aktivitätszunahme, die etwa 10 Stunden dauert. Von da an strebt die Kurve

ziemlich gleichmäßig und linear einem ausgeprägten Maximum im Stadium der weißen Vorpuppen zu. Nach begonnener Verfärbung der Vorpuppen fällt die Aktivität innerhalb weniger Stunden stark ab und bleibt bei den voll ausgefärbten braunen Puparien auf einem konstant niedrigen Niveau.

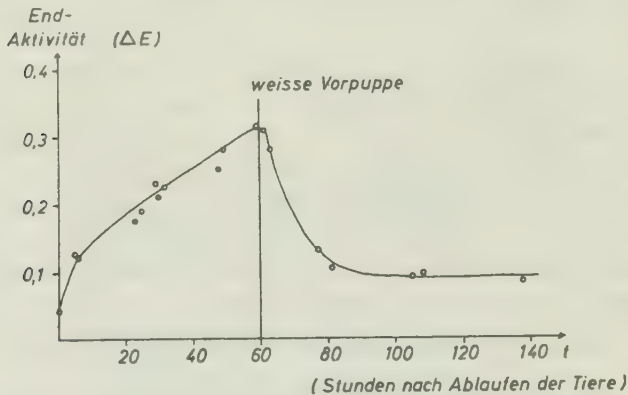


Abb. 14: Verlauf der Endaktivität bei *Calliphora*-Larven des späten III. Stadiums nach Verlassen der Nahrung

Der Anstieg der Tyrosinase-Aktivität, wie er dargestellt wurde, stimmt im allgemeinen mit Befunden von KARLSON u. WECKER²⁹⁾ überein. Eine von ihnen beschriebene Aktivitätszunahme um etwa 30 % über das Stadium der weißen Vorpuppen hinaus konnte allerdings nie beobachtet werden.

Zwischen den einzelnen Zuchten war eine beträchtliche biologische Schwankung der Fermentaktivität zu beobachten. Extrakte von Tieren der Gruppe 2 nach POSSOMPES zeigten z.B. bei einer durchschnittlichen Endaktivität von $M = 0,29$ Photometer-Einheiten eine Standardabweichung vom Mittelwert von 0,08, d.i. 28 %. Der Verlauf der Endaktivität mit dem Larvenalter (Abb. 14) wurde dadurch nicht prinzipiell verändert.

Der Anstieg der potentiellen Tyrosinase-Aktivität erwies sich als empfindlich gegenüber Änderungen wichtiger Zuchtbedingungen wie Temperatur und Ernährung.

Der Einfluß der Temperatur:

Larven derselben Zucht, die eben vom Futter abliefen, wurden in Parallelserien bei 15 und 30° C gehalten. Der Anstieg der Fermentaktivität wurde wie oben bis zur Verpuppung der Tiere verfolgt.

In Abb. 15 ist wiederum die Endaktivität gegen die Zeit nach Ablafen vom Futter aufgetragen.

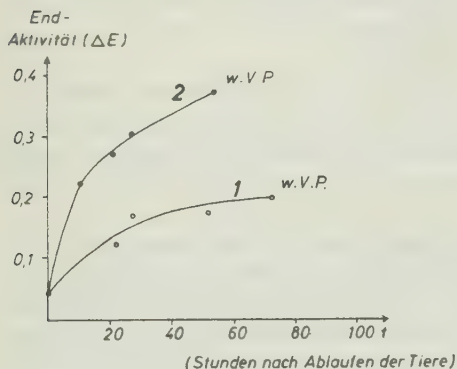


Abb. 15:
Einfluß der Temperatur
auf den Anstieg der
Endaktivität bei Lar-
ven des späten III.
Stadiums. 1 bei 15° C
2 bei 30° C

Man sieht deutlich, daß die Tyrosinase-Aktivität von weißen Vorpuppen der 15°-Gruppe weit hinter der Endaktivität von weißen Vorpuppen der 30°-Gruppe zurückbleibt. Die Fermentaktivität steigt bei höheren Temperaturen rascher und stärker an. Der in Abb. 14 dargestellte Kurvenverlauf wurde an Tieren gefunden, die bei 25° C gehalten wurden und liegt zwischen den beiden Kurvenzügen von Abb. 15.

Dieser Befund ist überraschend, wenn man an Arbeiten denkt, die sich mit dem Einfluß von Temperaturreizen auf die Melaninbildung bei Insekten befassen. An mehreren Objekten wurde gezeigt, daß die Pigmentablagerung mit an-

steigender Temperatur abnimmt (bei der Wanze *Perillus* maximale Melaninbildung bei 18-24° Zuchttemperatur, minimale Melaninbildung bei 29-35° C⁴⁰), während nach den vorliegenden Ergebnissen die potentielle Tyrosinase-Aktivität (auf welche die Melaninbildung zurückgeht) mit der Temperatur ansteigt.

Der Einfluß des Hungerns:

Es werden Tiere etwa 24 Stunden vor spontaner Beendigung der Nahrungsaufnahme (frühes III. Stadium) aus dem Futter genommen. Ihre Tyrosinase-Aktivität wird im Stadium der weißen Vorpuppen gemessen und mit Werten verglichen, die an weißen Vorpuppen von normal abgelaufenen Maden der gleichen Zucht gefunden wurden.

Die Tiere, die ihre obligatorische Freßperiode beenden konnten, wiesen in allen untersuchten Fällen höhere Tyrosinase-Aktivitäten auf, als solche, die zu früh vom Futter genommen worden waren.

2. Der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit:

Trägt man nun anstelle der Endaktivität die reziproke Halbaktivierungszeit gegen die Zeit nach Ablafen vom Futter auf, so ergibt sich ein Kurvenverlauf, wie er in Abb. 16 dargestellt ist. Er entspricht im allgemeinen dem Anstieg der Endaktivität in Abb. 14.

Im Zeitpunkt des Ablaufens vom Futter zeigt die aktivierende Komponente eine noch sehr geringe Aktivität; die reziproke Halbaktivierungszeit beträgt 0,020 - 0,025. Sie steigt während der folgenden 10-15 Stunden ähnlich wie die Endaktivität relativ stark an. Die maximale Aktivität des Aktivators (0,07) wird jedoch abweichend vom Verlauf der Endaktivität bereits 10-20 Stunden vor dem Stadium der weißen Vorpuppen erreicht. Die für weiße Vorpuppen gefundenen reziproken Halbaktivierungszeiten lagen meist unter diesem Maximalwert. Sie werden gleichlaufend mit der Ausbildung des

Pupariums zunehmend kleiner. Extrakte voll ausgefärbter und verhärteter Puparien aktivierten nur mehr sehr langsam (rez. Halbakt. Zeit 0,015 - 0,017).

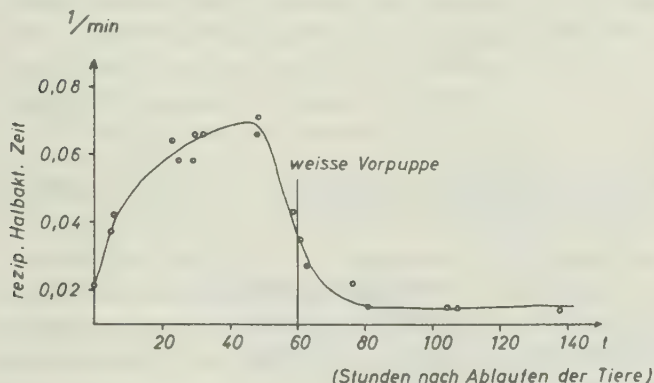


Abb. 16: Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit bei *Calliphora*-Larven des späten III. Stadiums.

Der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit bei Temperaturen von 15 und 30° (siehe oben) ist in Abb. 17 dargestellt. Man erkennt, daß ein Temperaturunterschied von 15° C sich überraschenderweise nur sehr geringfügig auf den Gehalt an Aktivatorenzym auswirkte.

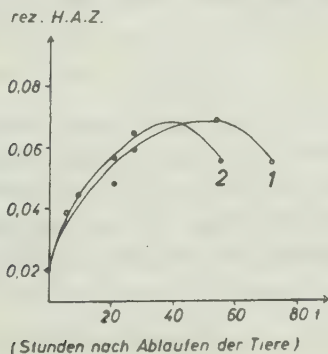


Abb. 17:
Einfluß der Temperatur auf
den Anstieg der rez. Halb-
akt. Zeit bei Larven des
späten III. Stadiums.

- 1 bei 15° C
- 2 bei 30° C

Diskussion:

Calliphora-Larven zeigen erst kurz vor Verlassen des Futters meßbare Tyrosinase-Aktivitäten. Unmittelbar nach Ablaufen steigen Proenzym- und Aktivatorkonzentration beträchtlich an. Der Beginn der Entwicklung des Tyrosinase-Systems fällt also zeitlich zusammen mit einer Verhaltensänderung, die eine Zäsur der Larvenentwicklung darstellt.

Die Verhaltensänderung signalisiert Vorgänge, die zu diesem Zeitpunkt einsetzen und den Larvenorganismus allmählich umstimmen. Untersuchungen an Lepidopteren lassen vermuten, daß sich das Hormongleichgewicht verschiebt. PIEPHO⁴¹⁾, CASPARI u. PLAGGE⁴²⁾, KAISER⁴³⁾ u.a. machten einen Zusammenhang der Verhaltensänderung mit dem Metamorphose-Hormon sehr wahrscheinlich.

BÜCKMANN⁴⁴⁾ konnte bei Raupen von *Cerura vinula* einen auffallenden Farbwechsel nach Beendigung der Futteraufnahme beobachten und später (KARLSON u. BÜCKMANN⁴⁵⁾) als frühe Wirkung des Ecdysons identifizieren. Der Einfluß langsam steigender Konzentrationen des Hormons ruft bei den Tieren verschiedene aufeinanderfolgende Färbungsstadien hervor. Befunde von KARLSON u. HANSER⁸⁾ an Calliphora-Larven (Zunahme der Reaktionsbereitschaft der Epidermis während des letzten Larvenstadiums) wurden im Sinne einer ebenfalls früh - bereits einige Zeit vor der kritischen Periode der Verpuppung - einsetzenden Sekretion des Metamorphose-Hormons interpretiert.

Die eigenen Versuche zeigen einen Anstieg der Endaktivität und der reziproken Halbaktivierungszeit, die hier besonders interessiert, gerade zum Zeitpunkt der Verhaltensänderung. Ein kausaler Zusammenhang zwischen ansteigendem Hormontiter und zunehmender Wirksamkeit des Aktivatorenzyns war anzunehmen.

Das Metamorphose-Hormon könnte eine Kontrolle auf folgende Weise ausüben:

- a) Eine zunehmende Wirksamkeit des Aktivatorenzyms resultiert aus einem steigenden Hormontiter im Gewebe (Theorie der Hormonkonzentration, PIEPHO 1942⁴⁶)).
- b) Sie kommt durch eine zunehmend längere Einwirkungszeit einer bestimmten Hormon-Konzentration zustande (Theorie der Einwirkungszeit, KARLSON 1955⁴⁷)).
- c) Beides zugleich.

III. Experimentelle Beeinflussung des Tyrosinase-Systems bei Calliphora:

1. Ausschaltung der Hormon-Drüsen:

Wenn nun ein Zusammenhang zwischen Hormon-Konzentration und Wirksamkeit des Aktivatorenzyms besteht, so sollte eine weitere Klärung des Problems durch experimentelle Änderung des Hormontiters bei Calliphora-Larven zu erreichen sein. Diese Überlegung veranlaßte mich, zunächst die ecdysonproduzierenden Drüsen auszuschalten.

Die Exstirpation von Organen endokriner Funktion gehört bekanntlich zu den klassischen Methoden der Hormon-Physiologie. Auf Grund von Ausfallserscheinungen, die nach Ausschalten einer Hormon-Drüse auftreten, lassen sich Schlüsse ziehen auf die Wirkung des Hormons. Als "Ausfallserscheinung" sollten sich bei Calliphora-Larven Abweichungen von denjenigen Werten des Tyrosinase-Systems zeigen, die charakteristisch sind für den ungestörten Verlauf im normal sich entwickelnden Tier.

Bildungsort des Ecdysons ist bei Larven von Calliphora der Weismannsche Ring (VOGT⁵), POSSOMPES⁶), KARLSON u. HANSER⁸)). Dies ist eine für cyclorrhaphe Dipteren eigentümliche Drüse, die nach ihrem Entdecker WEISMANN⁴⁸) benannt ist. Sie liegt im vorderen Körperdrittel der Larve zwischen den Cerebroid-Ganglien und zieht sich ringförmig um die Aorta (Abb. 18).

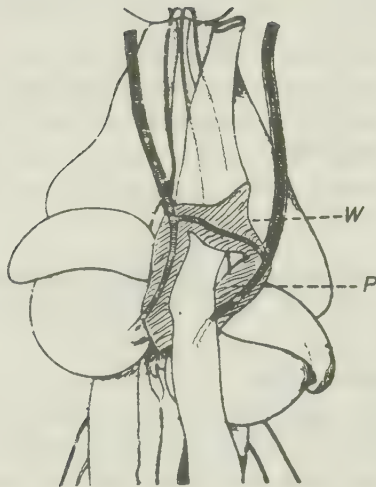


Abb. 18:

Lage des Weismannschen
Ringes bei Calliphora
(nach POSSOMPES)

W Weismannscher Ring
(Drüsengewebe hier
dunkel gezeichnet)

P Peritrachealdrüse

Man kann 3 histologische Bestandteile des Ringes unterscheiden:

Eine Gruppe großer Zellen bildet die Hauptmasse der Ringdrüse (große Schenkelzellen nach VOGT). Sie liegen besonders den beiden Längstracheen an und wurden deshalb von POSSOMPES Peritrachealzellen genannt (Peritrachealdrüse). Diese Zellen produzieren das Metamorphose-Hormon Ecdyson.

Während die Peritrachealdrüse im letzten Larvenstadium ein beträchtliches Wachstum erfährt, besitzen die Zellverbände des Corpus allatum (Bildungsort des Juvenil-Hormons) und des Corpus cardiacum ein relativ geringes Volumen.

Die Ausschaltung der Ringdrüse ist bereits von früheren Autoren durchgeführt worden:

a) durch Schnürung

b) durch Exstirpation

operative Entfernung (VOGT, POSSOMPES)
Zerstörung in situ (BURTT⁴⁹)).

Die experimentelle Durchführung dieser Verfahren ist im Versuchsteil beschrieben.

a) Schnürungsversuche:

Da die Schnürung die einfachste Methode ist, wurde zunächst das Tyrosinase-System bei geschnürten Tieren verfolgt.

Es schien zweckmäßig, den Eingriff an möglichst jungen Tieren durchzuführen, d.h. an Larven der Gruppe 1 (5 Tage alt), die einen relativ niedrigen Hormonspiegel aufweisen sollten. Um die Sterblichkeit durch faulende Futterreste in Kropf und Darm herabzusetzen, waren die Tiere bereits 15-20 Stunden vor Anlegen der Ligatur vom Futter genommen worden. Neben Tieren der Gruppe 1 wurden auch Tiere der Gruppe 2-3, wie sie im Calliphora-Test verwendet werden, geschnürt.

Die Abdomina der geschnürten Tiere wurden am ersten und den folgenden Tagen nach der Schnürung auf den Stand von Endaktivität und Halbaktivierungszeit untersucht. Die Werte wurden mit denen von ungeschnürten Tieren der gleichen Zucht verglichen.

Die Ergebnisse waren ziemlich unbefriedigend und wenig klar:

Das Tyrosinase-System schien durch Anlegen der Ligatur und die damit verbundene Ausschaltung des Weismannschen Ringes nicht signifikant beeinflusst zu werden. Endaktivität und reziproke Halbaktivierungszeit stiegen nach Schnürung zuerst auf Werte an, die nur wenig unter denen nicht geschnürter Kontrolltiere lagen. Im weiteren Verlauf war allerdings eine gewisse Hemmung in der Entwicklung des Tyrosinase-Systems festzustellen.

Messungen waren jedoch nur bis etwa 4 Tage nach Schnürung möglich; später wurde die Mortalität (toxische Schwarzfärbung) der geschnürten Tiere überaus groß. Da die Schnürung einen starken Eingriff darstellt, schien es durchaus möglich, daß die bei geschnürten Tieren gefundenen relativ geringen Abweichungen des Tyrosinase-Systems auf Allgemein-

schädigung zurückgingen. Offensichtlich war die Schnürungstechnik zur Lösung des vorliegenden Problems nicht geeignet.

b) Die Exstirpationsmethoden nach VOGT, POSSOMPES u. BURTT schienen ein längeres Überleben der behandelten Tiere ohne größere Allgemeinschädigung zu gewährleisten.

Es wurde zunächst das von POSSOMPES beschriebene Verfahren angewandt. Der an sich schwierige Eingriff gelang nach einiger Übung meist relativ gut. Die postoperative Mortalität lag jedoch aus irgendwelchen Gründen in allen Fällen zu hoch. Und da es gerade darauf ankam, größere Serien pro Versuch einsetzen zu können, wandten wir uns schließlich dem Verfahren von BURTT zu. Das Gewebe der Ringdrüse wird dabei durch Hitze-Einwirkung (Elektrokauter) zerstört. Vorteilhaft ist, daß dieser Eingriff ohne Operation, also durch die Cuticula hindurch erfolgen kann.

Die Überlebensrate betrug etwa 60 %. Von diesen Tieren verpuppten sich innerhalb der nächsten 4-6 Tage 5-10 %.

Die Tiere konnten immer etwa 20 Tage, manche bis zu 28 Tage in gutem Zustand erhalten werden. Damit war die Voraussetzung für eine Beobachtung des Tyrosinase-Systems über längere Zeit gegeben.

Ergebnisse:

Aus Abb. 19 und 20 geht hervor, daß an Endaktivität und reziproker Halbaktivierungszeit innerhalb von etwa 10 Tagen nach Exstirpation keine außergewöhnlichen Veränderungen festzustellen sind. Erst 10-14 Tage nach Kauterisieren traten auffallende Abweichungen auf. Nun wird auch verständlich, daß durch Schnürung innerhalb von 4-5 Tagen praktisch keine Wirkung erzielt werden konnte.

Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit:

Trägt man die reziproke Halbaktivierungszeit gegen die

Zeit nach Kauterisieren auf, so ergibt sich für die Aktivität des aktivierenden Prinzipes der in Abb. 19¹ dargestellte Verlauf (Tiere der Gruppe 2-3; bei 20° C gehalten):

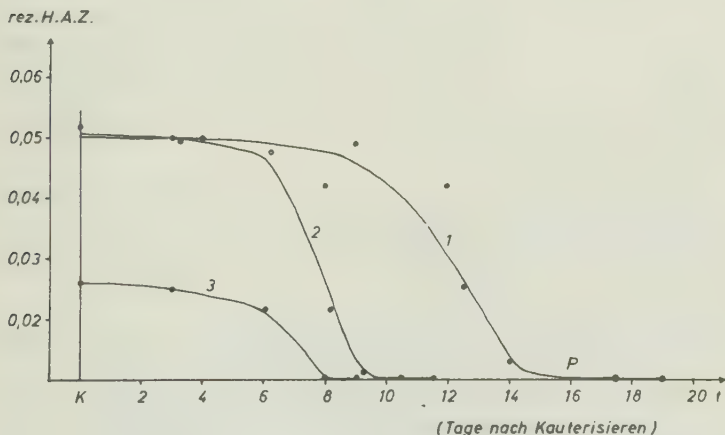


Abb. 19: Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit
kauterisierter Larven von Calliphora

K Zeitpunkt des Kauterisierens
P Zeitpunkt in dem keine Aktivierung mehr eintritt
Kurve 1 Tiere kauterisiert Gruppe 2-3; Temp. 20° C
Kurve 2 Tiere kauterisiert Gruppe 2-3; Temp. 30° C
Kurve 3 Tiere kauterisiert Gruppe 1; Temp. 20° C

Während der ersten 6-8 Tage nach Exstirpation änderte sich die reziproke Halbaktivierungszeit kaum; sie stieg in einigen Fällen geringfügig an, ein Absinken wurde nur selten beobachtet. Die Aktivität der protyrosinase-aktivierenden Komponente hält sich zunächst auf dem in der Normalentwicklung erreichten Niveau. Später beobachtet man eine mehr oder weniger starke Verlängerung der Halbaktivierungszeit, bis sich der Extrakt nach 13-16 Tagen überhaupt nicht mehr aktiviert. Das Tyrosinase-System kommt in diesem Zeitpunkt offensichtlich völlig zum Erliegen.

Der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit, wie er beschrieben wurde, erwies sich als abhängig.

vom Stand der physiologischen Entwicklung im Zeitpunkt des Kauterisierens. Bei Tieren der Gruppe 1 trat ein völliger Aktivitätsabfall bereits 4-5 Tage früher ein als bei Tieren der Gruppe 2-3, deren Entwicklung weiter fortgeschritten war (Abb. 19/3). Dieser Umstand scheint dagegen zu sprechen, daß das Phänomen auf eine Hungerwirkung zurückzuführen ist.

von der Temperatur, bei der die kauterisierten Tiere gehalten wurden. Der Temperatur-Einfluß war relativ groß (Abb. 19/2). Eine Temperatur von 30° ließ die Aktivität schon nach 9-10 Tagen völlig absinken. Diese Befunde sind wohl in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß das Absinken des Tyrosinase-Systems durch die Inaktivierung eines Stoffes im Gewebe zustande kommt. Eine Erhöhung der Temperatur würde den Abbau naturgemäß beschleunigen.

Verlauf der Endaktivität:

Trägt man in gleicher Weise nicht die reziproke Halbaktivierungszeit, sondern die erreichte Endaktivität auf, so ergibt sich die in Abb. 20 dargestellte Kurve 1 (Tiere der Gruppe 2-3, bei 20° C gehalten).

Man erkennt, daß die Endaktivität nach Kauterisieren noch um etwa 50 % ansteigt. Bei Tieren anderer Zuchten, die auf derselben Altersstufe und mit der gleichen Endaktivität kauterisiert wurden, nahm sie um bis zu 100 % zu; selten blieb sie auf dem Niveau der Ringzerstörung. Nach einiger Zeit wird eine maximale Endaktivität erreicht (meist höher als die Aktivität weißer Vorpuppen derselben Zucht), die später analog zum Abfall der Aktivität des Aktivator-Enzyms allmählich absinkt. Die Extrakte zeigen, wie erwähnt, nach etwa 14 Tagen keine Aktivierung mehr.

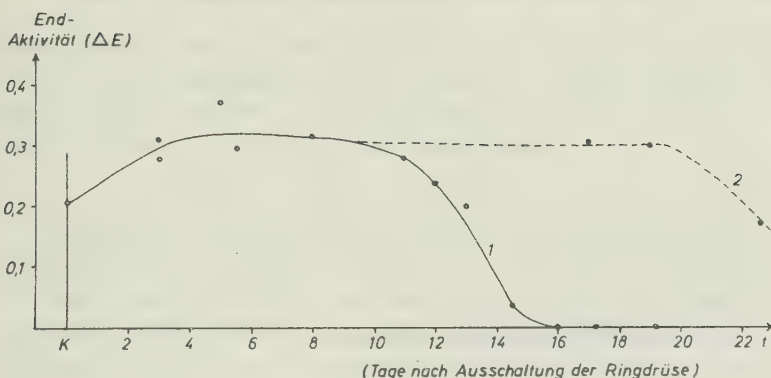


Abb. 20: Verlauf der Tyrosinase-Aktivität kauterisierter Larven von *Calliphora*

K Zeitpunkt des Kauterisierens

Kurve 1 Verlauf der gefundenen Endaktivität

Kurve 2 Verlauf der potentiellen Tyrosinase-Aktivität

Aus Abb. 19 und 20 geht hervor, daß reziproke Halbaktivierungszeit und Endaktivität absinken. Daraus war zunächst zu schließen, daß die Proenzym-Konzentration parallel mit der Aktivator-Konzentration abnimmt. Dieses vorläufige Ergebnis bedurfte jedoch weiterer Klärung. Es schien möglich, daß bei der vorliegenden geringen Aktivator-Konzentration keine vollständige Aktivierung eintrat (vergl. Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung).

Deshalb wurde ein nicht mehr aktivierender Extrakt aus kauterisierten Tieren mit vorgebildetem Aktivator angereichert (siehe Versuchsteil).

Sofort nach Zusatz des Normalextraktes wurden in kurzen Abständen Aktivitätsbestimmungen gemacht.

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, aktivierte der angereicherte Extrakt kauterisierter Tiere in kürzester Zeit zu hoher Endaktivität. Bemerkenswert ist, daß der Aktivierungsver-

lauf hierbei nicht mehr einer sigmoiden Kurve folgt.

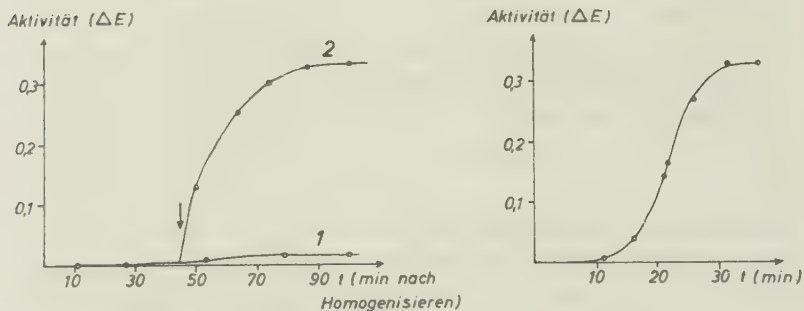


Abb. 21: links: Kurve 1 geringe Aktivierung eines Extrakts
kauterisierter Tiere
Kurve 2 Aktivierung nach Zusatz (↓) von 10%
Normalextrakt
rechts: als Vergleich Verlauf der normalen auto-
katalytischen Aktivierung

Auf Grund dieser Befunde muß angenommen werden, daß bei kauterisierten Tieren nach einiger Zeit ein Sonderfall der Protyrosinase-Aktivierung vorliegt. Die Konzentration (Wirksamkeit) des Aktivatorenzyns wird zu diesem Zeitpunkt offensichtlich für die Endaktivität limitierend, obwohl die Tyrosinase-Aktivierung autokatalytisch erfolgt. Unterschreitet die Konzentration einen bestimmten Minimalwert, so tritt die Umwandlung des Proenzyns nur sehr zögernd ein oder unterbleibt ganz (vergl. Hemmung der Aktivierung durch Verdünnungen von 1:60 oder mehr, S.14).

Erst durch Zusatz des vorgebildeten Aktivators wird die Minimalkonzentration erreicht oder überschritten; es kann Aktivierung bis zu einer der Proenzym-Konzentration entsprechenden Endaktivität eintreten. (In allen Stadien der Normalentwicklung dagegen bestimmte die Proenzym-Konzentration die Endaktivität; durch Zusatz des vorgebildeten Aktivators konnte bei diesen Versuchen weder die Endaktivität

noch die Aktivierungszeit beeinflußt werden.)

Bei Zugabe des Extrakts nicht kauterisierter Tiere wird also die volle Aktivierung des Proenzym erreicht. Der Verlauf der potentiellen Tyrosinase-Aktivität (Konzentration des Proenzym) konnte so gefunden werden:

In Abb. 20 zeigt die Kurve 2 (punktiert) diesen Verlauf im Vergleich zur tatsächlich in den Extrakten gemessenen Tyrosinase-Aktivität. Die Konzentration der Protyrosinase ist lange Zeit praktisch unverändert. Sie sinkt anscheinend erst sehr spät allmählich ab. Extrahiert man Tiere etwa 21 Tage nach Kauterisieren, so aktivieren diese Extrakte auch nach Zusatz von Normalextrakt nur mehr zu niedrigerer Aktivität.

Diskussion:

Die Versuche zeigen, daß bei kauterisierten Larven des III. Stadiums, die sich nicht mehr verpuppen können, eine Aktivierungsstörung des Tyrosinase-Systems auftritt. In der ungestörten Postembryonal-Entwicklung beendet die Puparisierung einen Abschnitt steigender Aktivator-Aktivität. Dieser charakteristische Prozess läuft nach Zerstörung der Ringdrüse in entgegengesetzter Richtung ab. Es lassen sich insgesamt 2 Hauptphasen unterscheiden: nach Kauterisieren eine Periode gleichbleibender Aktivität und dann ein Absinken.

Bei den beschriebenen Vorgängen handelt es sich kaum um eine Hungererscheinung. Die Abhängigkeit vom physiologischen Alter im Zeitpunkt des Kauterisierens wäre sonst nicht recht verständlich. Zudem weisen die Tiere gerade kurz vor der Verpuppung große Energiedepots in Form des gelappten Fettgewebes auf.

Aus der zeitlichen Korrelation zwischen steigender Hormonausschüttung und zunehmender Wirksamkeit des Aktivators in der Normalentwicklung des III. Larvenstadiums ließ sich

bereits ein Kausalzusammenhang ableiten. Nimmt man an, daß der Anstieg durch das Ecdyson gesteuert wird, so sollte die Abnahme in ähnlicher Weise durch Konzentrationsänderungen des Hormons bedingt sein. Diese Änderung kommt wohl durch Inaktivierung im Gewebe zustande. (Versuche über den Einfluß der Temperatur sprechen dafür.) Der Abbau scheint allerdings ziemlich langsam zu erfolgen, denn es dauert eine beträchtliche Zeit, bis die Aktivität des Aktivators völlig abgesunken ist. Vielleicht ist dies auch durch eine verlängerte Einwirkungszeit des Hormons zu erklären.

2. Injektionsversuche:

Die Exstirpation des Weismannschen Ringes hatte ein Absinken der Aktivität des protyrosinase-aktivierenden Prinzips zur Folge. Wird dieser Defekt spezifisch durch Zerstörung der Peritrachealzellen der Ringdrüse verursacht, so sollte er im Gegenversuch durch Injektion des Wirkstoffes dieser Zellen, das Ecdyson, zu beheben sein.

Dazu wurden Tiere verwendet, die im Zeitpunkt des Kauterisierens der Gruppe 2-3 nach POSSOMPES angehörten.

Für die Injektion standen hochangereicherte Fraktionen des Metamorphose-Hormons zur Verfügung, die in unserem Laboratorium gewonnen worden waren. (In einem Fall konnte ein Kristallinat verwendet werden.) Die Extrakte wurden vor Injektion jeweils im Calliphora-Test auf ihre Hormonaktivität und Toxizität geprüft. Die Aktivität der gereinigten Fraktionen betrug etwa 1 Calliphora-Einheit⁺) (1 C.E.) pro 0,5 γ , die des kristallisierten Ecdysons 1 C.E. / 0,0075 γ .

Die Injektionsmethode ist im experimentellen Teil beschrieben.

⁺) Als 1 Calliphora-Einheit (C.E.) ist die Menge des Wirkstoffes definiert, die pro Tier nötig ist, um bei 50-70 % der geschnürten Tiere im Test Puparisierung auszulösen.

Da das Hormon eine Reaktivierung auslösen sollte, mußte es kauterisierten Tieren injiziert werden, deren Tyrosinase-System in vitro möglichst geringe Aktivierung zeigt. Andererseits konnte man annehmen, daß die Reaktionsbereitschaft auf zugeführtes Hormon abnehmen würde (vergl. dazu KARLSON u. HANSER⁸⁾). Zudem war im späteren Verlauf ein Absinken der Proenzym-Konzentration zu beobachten. Es schien somit günstiger, nicht zu spät zu injizieren. Wir wählten einen Zeitpunkt etwa 1 Tag vor völligem Abfall der Aktivierung.

Einer verminderten Reaktionsbereitschaft sollte auch die Hormondosis Rechnung tragen, die den kauterisierten Tieren injiziert wurde. In Anlehnung an Versuche von KARLSON u. HANSER betrug sie 5 oder 10 C.E. pro Tier.

Die injizierten Tiere erwiesen sich als sehr empfindlich. Etwa 30 % der Larven starben innerhalb 24 Stunden nach der Injektion. In allen Fällen traten weitere Verluste durch toxische Schwarzfärbung ein, auch bei Verwendung des Hormonkristallisats. Nur etwa 50 % der Larven überlebten 3 Tage. Die Wirkung des Ecdysons konnte somit leider nicht über längere Zeit beobachtet werden.

Keines der Tiere bildete nach der Injektion ein Puparium aus. Befunde von KARLSON u. HANSER⁸⁾ machen dies verständlich. Danach erreicht die Reaktionsbereitschaft der Epidermis von Calliphora-Larven des III. Stadiums zur Verpuppung hin ein Maximum und wenn die Spontanverpuppung durch Schnürung verhindert wird, so nimmt die Bereitschaft, auf zugeführtes Metamorphose-Hormon (10 C.E.) mit Puparisierung zu reagieren, innerhalb weniger Tage beträchtlich ab. Bei den eigenen Versuchen ist sie wohl in dem Zeitpunkt, in dem die kauterisierten Tiere injiziert werden, bereits so weit abgesunken, daß es bei der verwendeten Dosis überhaupt nicht mehr zu Puparisierung kommen kann.

Endaktivität und reziproke Halbaktivierungszeit wurden jeweils an Extrakten von 3-4 Tieren bestimmt, die ohne jedes äußere Anzeichen pathologischer Veränderungen (z.B. Verfärbung) waren. Die Messungen wurden kurz vor Injektion und dann in Abständen von 24 Stunden durchgeführt.

Ergebnisse:

Das zugeführte Hormon bewirkte tatsächlich eine Aktivierung des Tyrosinase-Systems im Sinne unserer Arbeitshypothese. Aus Abb. 22 geht seine Wirkung deutlich hervor:

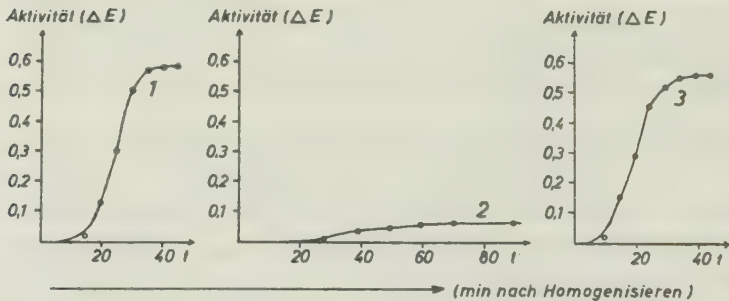


Abb. 22: Kurve 1 Aktivier. eines Extrakts 6 Tage nach Kaut.
Kurve 2 Aktivier. eines Extrakts im Zeitpunkt der Injektion
Kurve 3 Aktivier. eines Extrakts 48 Stunden nach Injektion

Kurve 3 wurde 48 Stunden nach Injektion aufgenommen. Sie ist praktisch identisch mit Kurve 1 und stimmt mit dieser in Endaktivität und Halbaktivierungszeit fast überein. Der Extrakt hat eine maximale Aktivierungsfähigkeit wieder erlangt; denn in kurzer Zeit wird alles vorhandene Proferment aktiviert. Kurve 2 zeigt den Aktivierungsverlauf eines Extrakts im Zeitpunkt der Hormoninjektion. Die Aktivierungsfähigkeit ist sehr gering; bei einer Halbaktivierungszeit von 40 min wird eine Fermentaktivität von 0,07 Photometer-Einheiten erreicht. Zum Vergleich zeigt Kurve 1 die Akti-

vierung eines Extrakts kauterisierter Tiere bei hoher Aktivität des aktivierenden Prinzipes (etwa 6 Tage nach Kauterisieren). Der Extrakt aktiviert in kurzer Zeit zu seiner vollen Endaktivität von 0,6 Photometer-Einheiten.

Der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit:

Trägt man wiederum die reziproken Halbaktivierungszeiten gegen die Zeit nach Kauterisieren auf, so ergibt sich das in Abb. 23 dargestellte Bild:

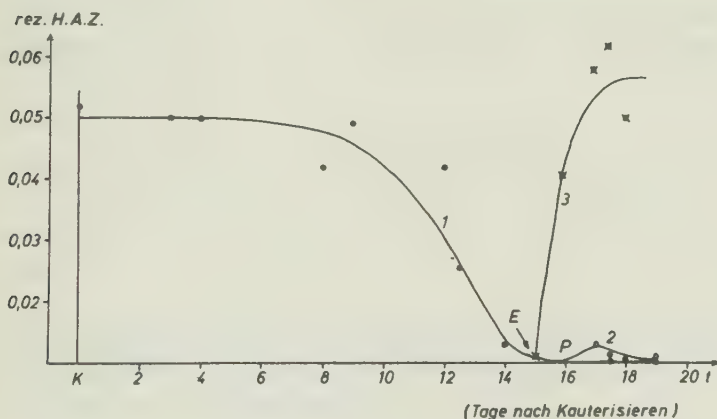


Abb. 23: Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeiten

- Kurve 1 vor Injektion des Hormons (vergl. Abb. 19)
- 2 nach Injektion von aqua bidest. (Kontrolle)
- 3 nach Injektion von Ecdyson (5 C.E.)
- K Zeitpunkt des Kauterisierens
- E Injektion von Hormon bzw. aqua bidest.
- P vollständiger Aktivitätsabfall des Aktivator-Enzyms bei nicht injizierten Tieren

Der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeiten entspricht zunächst Abb. 19/1, der reziproken Halbaktivierungszeit bei kauterisierten Tieren (Gruppe 2-3). Kurz vor völligem Verlust der aktivierenden Komponente wurde das Ecdyson injiziert; im angegebenen Fall 15 Tage nach Kauterisieren. Ein ziemlich steiler Anstieg der reziproken Halbaktivierungszeit folgt. Etwa 24-36 Stunden nach Injektion erreichte sie

wieder das Niveau, auf dem sie sich vor ihrem Absinken befand; in einigen Fällen wurde es überschritten.

Die untere flache Kurve (Kurve 2) zeigt die reziproke Halbaktivierungszeit der Kontrolltiere. Der kleine Anstieg ist wohl auf die Injektion des aqua bidest. zurückzuführen.

Der Verlauf der Endaktivität:

In Abb. 24 ist die Endaktivität gegen die Zeit nach Kauterisieren aufgetragen.

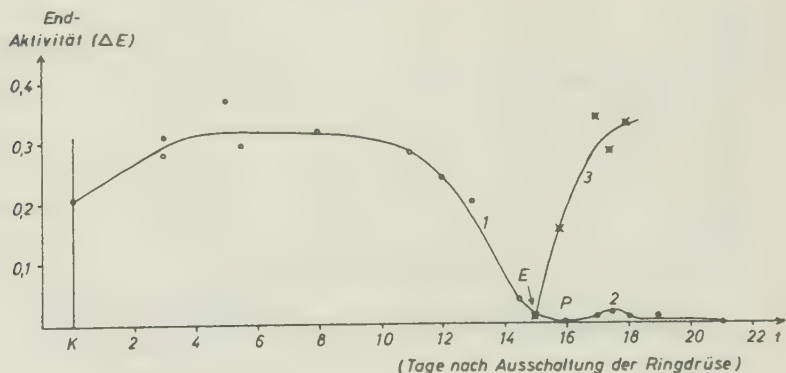


Abb. 24: Verlauf der Endaktivitäten

- Kurve 1 vor Injektion des Hormons (vergl. Abb. 20/1)
2 nach Injektion von aqua bidest. (Kontrolle)
3 nach Injektion von Ecdyson (5 C.E.)
K Zeitpunkt des Kauterisierens
E Injektion von Hormon bzw. aqua bidest.
P vollständiger Aktivitätsabfall des Aktivator-Enzyms bei nicht injizierten Tieren

Bis zur Injektion des Ecdysons ergibt sich wiederum der in Abb. 20 angegebene Verlauf der Endaktivität bei kauterisierten Tieren. Abb. 23 und 24, der Verlauf der reziproken Halbaktivierungszeit bzw. der Endaktivität bei hormon-injizierten Tieren, gleichen sich weitgehend. Man erkennt deutlich, daß die in vitro erreichte Endaktivität hierbei von

der Aktivität des Aktivatorenzymns abhängt; die potentielle Tyrosinase-Aktivität nämlich ist in dem dargestellten Zeitraum konstant (nach Versuchen des vorhergehenden Abschnittes). Es wird folglich eine Endaktivität, die der Protyrosinase-Konzentration entspricht, etwa 24-36 Stunden nach der Injektion wieder erreicht. Die Werte lagen meist auf oder nur wenig unter dem ursprünglichen Niveau.

Extrakte aus Tieren, die mit aqua bidest. injiziert wurden, zeigten etwa 24 Stunden nach der Injektion minimale Fermentaktivität, die wohl auf die erwähnte Schwankung der reziproken Halbaktivierungszeit zurückzuführen war (flache untere Kurve, Abb. 24).

DISKUSSION

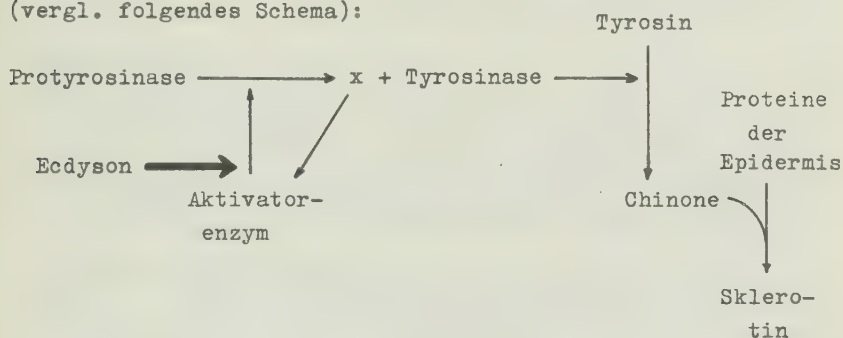
Das "Puparisierungshormon" Ecdyson löst bei erwachsenen Fliegenlarven eine Sklerotisierung weicher Larvencuticula aus. Bei diesem Prozess spielt die Tyrosinase eine wichtige Rolle. Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Tyrosinase bei Calliphora erbrachten gleichzeitig einen Beitrag zum Mechanismus der Hormonwirkung:

Die Tyrosinase liegt bei Calliphora in Form eines ungewöhnlichen und komplizierten Systems vor, das sich aus den Hauptkomponenten Protyrosinase, Aktivatorenzym und Tyrosinase zusammensetzt. Unsere Befunde weisen damit eine weitgehende Übereinstimmung mit den HOROWITZschen Ergebnissen an Drosophila auf. Zusätzlich konnte ein nativer Inhibitor der Protyrosinase gefunden werden. Eine gewisse Ähnlichkeit der Tyrosin-Oxydation zur Blutgerinnung der Wirbeltiere scheint zu bestehen. Analog zur Bildung des Thrombins entsteht die aktive Phenoloxydase in einem komplexen (möglicherweise nicht rein autokatalytischen) Aktivierungsvorgang; die Einwirkung des aktiven Enzyms auf sein Substrat führt in einem Fall zum Fibrin, im andern zu chinoiden Oxydationsprodukten des Tyrosins. Diese sollen neben ihrer Funktion im Sklerotisierungsvorgang auch an der Blutgerinnung der Insekten und am Wundverschluß beteiligt sein.

Die Sklerotisierung wird bei Calliphora hormonal ausgelöst. Für die aktivierende Wirkung des Hormons auf das Tyrosinase-Multienzym-System waren verschiedene Erklärungen möglich. Der charakteristische Anstieg der Aktivatorkonzentration während des III. Larvenstadiums und das Absinken nach Ausschaltung der Hormondrüsen wies auf eine Beziehung zum Ecdyson hin. Diese Befunde lassen sich darüber hinaus als Hinweis deuten, daß die Sekretion des Metamorphose-Hormons bei Calliphora bereits mehrere Tage vor der kritischen Perio-

de der Verpuppung einsetzt (vergl. KARLSON u. HANSER⁸⁾).

Der Zusammenhang zwischen aktivierender Komponente und Ecdyson wurde schließlich durch die Injektionsversuche bewiesen: Das Hormon kontrolliert die Wirksamkeit oder Konzentration des Aktivatoroenzyms und vermag dadurch in der Tyrosin-Tyrosinase-Reaktion und im Sklerotisationsprozess eine geschwindigkeitsbestimmende Funktion auszuüben. Es greift in ein sehr effektives "Verstärker-System" ein, in dem ein Enzym die Bildung eines anderen Enzyms bewirkt (vergl. folgendes Schema):



Es liegt nahe, diesem Befund allgemeine theoretische Bedeutung beizumessen; denn damit ist ein Weg aufgezeigt, wie enzymatische Reaktionen hormonal gesteuert werden können: Ein "eingefrorenes" potentiellcs Enzym-System wird aktiviert und bisher blockierte Stoffwechselvorgänge werden eingeleitet. Für die Physiologie der Entwicklung insbesondere bei Wirbeltieren ließen sich dazu interessante Parallelen ziehen. Hormone wie Thyroxin, Testosteron und Oestradiol, über deren Wirkungsmechanismus im Entwicklungsgeschehen wir kaum etwas wissen, könnten in ähnlicher Weise Umfang und Geschwindigkeit enzymatischer Umsetzungen kontrollieren und dadurch charakteristische physiologische Wirkungen hervorbringen.

Für die aktivierende Wirkung des Hormons auf das Aktivatoroenzym sind verschiedene Erklärungen möglich:

1. Unter dem Einfluß des Ecdysons wird der vorgebildete Aktivator aus einem Zellkompartiment freigesetzt. (Die Änderung der räumlichen Ordnung von Enzymen innerhalb der Zelle hat SIEKEVITZ⁵⁰⁾ diskutiert).
2. Das Ecdyson fördert die reversible Dissoziation eines Aktivator-Inhibitor-Komplexes. Diese Annahme wird durch Auffinden eines nativen Inhibitors der Prototyrosinase (S.22) gestützt. Es ist allerdings noch nicht gelungen, einen Inhibitor des Aktivators und eine derartige Dissoziation in vitro zu finden.
3. Das Ecdyson stimuliert eine de novo - Synthese des Aktivatorproteins. Der langsame Anstieg der Aktivatorwirksamkeit während des späten III. Larvenstadiums weist auf diese Möglichkeit hin. Zudem lassen sich die Befunde von BÜCKMANN u. KARLSON⁴⁵⁾ (ecdysyonstimulierte Ommochromsynthese) im Sinne einer Protein-Synthese interpretieren.

Gegen diese Hypothese schienen zunächst die Injektionsversuche an kauterisierten Tieren zu sprechen, die zeigten, daß volle Aktivierungsfähigkeit des Enzymsystems etwa 24 Stunden nach Injektion wieder erreicht werden kann. Neueste Ergebnisse an Chironomus lassen diese Zeitspanne nicht zu kurz für eine Proteinsynthese erscheinen. CLEVER u. KARLSON (unveröffentlicht; vergl. Vortrag BEERMANN, Ges.Morph. Phys. München 10.5.1960) haben gefunden, daß das Ecdyson schon 2 Stunden nach Injektion eine charakteristische Änderung der Aktivität bestimmter Genorte hervorruft. An den aktivierten Stellen wird Ribonucleinsäure gebildet, die im Cytoplasma eine Proteinsynthese in Gang setzen könnte.

Es wird weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zwischen diesen Alternativen zu entscheiden. Wie sich bereits in der vorliegenden Arbeit zeigte, werden dabei allerdings beträchtliche Schwierigkeiten zu überwinden sein.

VERSUCHSTEIL:

Calliphora-Larven:

Die Calliphora-Larven stammten aus Massenzuchten unseres Institutes, die täglich frisch mit Muskelfleisch (möglichst fettfrei) von Pferd oder Rind gefüttert wurden. Die Zuchttraumtemperatur liegt bei 25° C. Es wird eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-70 % eingehalten.

Altersbestimmung der Larven:

Die 3 Larvenstadien L_1 , L_2 , L_3 lassen sich durch Anzahl und Art der funktionsfähigen Stigmenöffnungen unterscheiden:

Larven des I. Stadiums besitzen nur 1 Paar Stigmen, die am äußersten Hinterende des Körpers gelegen sind (metapneustisch).

Im II. Stadium kommt ein Paar weiter vorne gelegener Stigmen dazu, die mit den hinteren Stigmen durch die beiden großen längsverlaufenden Dorsaltracheenstämme in Verbindung stehen (peripneustisch).

Die Larve des III. Stadiums ist ebenfalls peripneustisch und vom vorhergehenden Stadium dadurch zu unterscheiden, daß die hinteren Stigmenplatten 3 feine zusammenlaufende Spalten aufweisen.

Larven des III. Stadiums können nach der Methode von POSSOMPES unterteilt werden. Sie beruht darauf, daß sich nach Beendigung der obligaten Freßperiode charakteristische Veränderungen des Kropfes beobachten lassen:

Während und unmittelbar nach der Futteraufnahme ist der Kropf prall mit Nahrungsstoffen gefüllt und erstreckt sich über $\frac{2}{3}$ der Länge des Tieres. Im weiteren Verlauf wird der Inhalt des Kropfes verdaut; der Kropf leert sich. Darauf wird er allmählich zurückgezogen und bildet kurz vor der Verpuppung nur mehr ein ovales Anhängsel des Ösophagus.

Es lassen sich folgende Gruppen unterscheiden:

- Gruppe 1 a Kropf prall gefüllt
- 1 b Kropf halb gefüllt
- 1 c Kropf fast leer
- Gruppe 2 Kropf nicht oder nur wenig zurückgezogen
- Gruppe 3 Kropf vollständig zurückgezogen
- Gruppe 4 letztes Stadium vor Ausbildung der weißen Vorpuppen; Cuticula wird zunehmend undurchsichtig; Kropf nicht mehr sichtbar.

Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität:

Zur Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität wurde ein photometrisches Verfahren gewählt, das auf MARKERT⁵¹⁾ zurückgeht und sich bei den Untersuchungen von HOROWITZ u. FLING bewährt hatte. Es wurde etwas modifiziert.

Das Verfahren hat den Vorzug, daß sich die Fermentaktivität damit sehr schnell bestimmen läßt. Dies war für Messungen während der Aktivierung unbedingt nötig. (Die manometrische Bestimmung der O₂-Aufnahme nach GRAUBARD u. NELSON⁵²⁾ erwies sich als zu langsam.)

Der photometrische Test ist zudem sehr empfindlich, so daß mit geringen Ferment-Konzentrationen (Verdünnung) gearbeitet werden konnte.

Prinzip: Bei der tyrosinase-katalysierten Oxydation von Tyrosin oder DOPA zu Melanin ist eines der ersten Zwischenprodukte ein roter Farbstoff, das DOPachrom (vergl. Abb. 2). Die Intensität der gebildeten Färbung ist unter gewissen Bedingungen proportional zur Fermentaktivität; seine Extinktion kann photometrisch gemessen werden.

Reagentien: Phosphatpuffer 0,065 m pH 6,0
wässrige DOPALösung 0,01 %
zu testender Fermentextrakt

Messung: 4 ml Phosphatpuffer, 1 ml DOPALösung (= 1 mg) und

0,4 ml Fermentpräparat werden in eine Küvette aus optischem Spezialglas der Schichtlänge 20 mm pipettiert. Es wird kurz umgeschüttelt und im Photometer Eppendorf bei einer Wellenlänge von 480 m μ (Cadmiumlampe) eine Extinktionszunahme ΔE nach genau 2 min gemessen.

Die Küvette steht dabei in der Bohrung eines Wärmemantels, der durch einen Umlaufthermostaten auf 28° C gebracht wird.

Bei dieser Temperatur und Verwendung von DOPA als Substrat ist ΔE bereits während der ersten Minuten nach Beginn der Testreaktion proportional zur Fermentaktivität (keine Verzögerung wie z.B. bei Verwendung von Tyrosin).

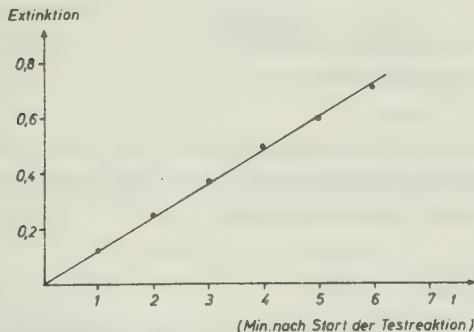


Abb. 25:
Extinktionszunahme
in Abhängigkeit
von der Zeit
(Substrat DOPA)

Die eingesetzte Substratmenge von 1 mg / Ansatz erwies sich als ausreichend für die Aktivität des Calliphora-Enzyms in den Routine-Tests; ebenso die Menge des im Testansatz gelösten Sauerstoffs.

Die Enzymprobe wird von 0,4 auf 5,4 ml verdünnt (eine Präparation der Konzentration 1:40 also auf 1:540 !). Bei dieser niedrigen Konzentration kann mitenthaltenes Proferment nicht während der Messung aktiviert werden (Abhängigkeit der Aktivierung von der Konzentration). Dies war bei Aufstellung einer Aktivierungskurve wichtig.

Verdünnungsreihen zeigten, daß unter den genannten Bedingungen eine direkte lineare Beziehung zwischen ΔE und der Fermentaktivität besteht bis zu Extinktionen von etwa 1,0 Photometer-Einheiten (Abb. 26).

Extinktion nach 2 Min.

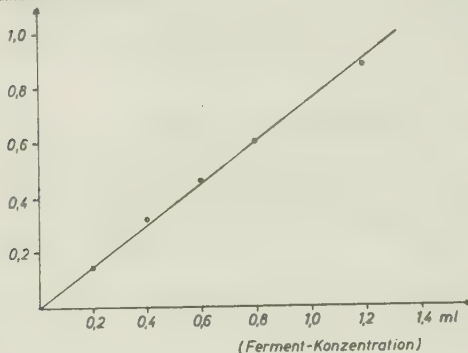


Abb. 26:
Abhängigkeit der
Extinktion von
der Fermentkon-
zentration (Sub-
strat DOPA)

Die bei den Routine-Tests gefundenen Extinktionen betragen dagegen maximal etwa 0,8 Einheiten und lagen somit innerhalb des Proportionalitätsbereiches.

Definition der Einheit:

Die Phenoloxydase-Aktivität wird direkt in Einheiten der Extinktion angegeben. Es entspricht also z.B. eine Aktivität von 0,5 einem ΔE von 0,5 Photometer-Einheiten.

Versuche zur Löslichkeit des Tyrosinase-Systems:

1. Herstellung eines rohen Tyrosinase-Extrakts:

Weißer Vorpuppen von *Calliphora* werden mit der 10-fachen Menge eiskalten Phosphatpuffers (0,065 m) vom pH 6,0 2 min im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Sofort anschließend wird 10 min bei etwa 25 000 g zentrifugiert (Servall-Zentrifuge). Der Zentrifugations-Überstand ist etwa 15 min nach Homogenisieren voll aktiviert (Aktivität im Mittel 1,0 Photometer-Einheiten); er zeigt eine rötliche Färbung und starke Opaleszenz.

Dieses Präparat kann ohne Aktivitätsverlust 3-4 Wochen in der Tiefkühltruhe bei -15°C aufbewahrt werden.

2. Zentrifugation eines rohen Tyrosinase-Extrakts:

Ein nach der angegebenen Vorschrift hergestellter Fermentextrakt wurde bei verschiedenen hohen Zentrifugalbeschleunigungen in der Spinco Ultra-Zentrifuge zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde resuspendiertes Sediment und Überstand auf Tyrosinase-Aktivität getestet.

3. Versuche, das aktive Ferment in echte Lösung zu bringen:

Tyrosinase-Extrakte wurden nach der oben beschriebenen Methode hergestellt.

Zu eisgekühltem Fermentextrakt wurden langsam verschiedene Mengen gekühlten n-Butanols zugesetzt (5, 10 und 15%; höhere Butanol-Konzentrationen waren denaturierend).

Nach 30 min (gelegentliches Schütteln) wurde der Butanol-Extrakt und eine Probe des unbehandelten Extrakts 1 Stunde bei 104 000 g zentrifugiert. Sediment und Überstand wurden anschließend auf Tyrosinase-Aktivität getestet. In gleicher Weise wurden statt Butanol folgende Reagenzien zu Fermentextrakten zugesetzt:

Äther: 5% und 10 % (10 % bereits stark denaturierend).

Ammonsulfat-Azeton:

Ammonsulfat	Azeton
0,1 Sätt.	1 vol (Originalvorschrift von WARD ³²⁾)
0,1	10 %
0,05	10 %
0,1	20 %

Äthylen-diamin-tetraacetat: Endkonzentration 0,5 %

Harnstoff wurde in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (in fester Form) bis zu 4 m.

Tab. 3: Vergleich der Phenoloxydase-Aktivität bei
einigen Insekten und Pflanzen.

Untersuchtes Objekt	Konz.	Aktivi- tät ΔE	Aktivie- rungszeit	Bemerkg.
Calliphora erythrocyt.	1:40	0,32	20 min	
Calliphora	1:10	1,30	10 min	
Sarcophaga fac.	1:10	0,17	4-5 Std.	
Vanessa urticae (Raupe)	1:20	0,22	1 Std.	vergl. Abb. 7
Tenebrio (Larven)	1:20	0,02	3 Std.	
Tenebrio (Puppen)	1:20	0,00	nicht meßbar	
Schistocerca greg. (Wildform)	1:10	0,00	nicht meßbar	
Schistocerca greg. (Albinostamm)	1:10	0,00	nicht meßbar	
Grillus camp. (Larve)	1:10	0,00	nicht meßbar	
Acheta dom. (Larve)	1:10	0,00	nicht meßbar	
=====				
Kartoffel	1: 2,5	0,90	keine	fast farblos
Kartoffel	1:20	0,12	keine	
Kartoffel	1:40	0,05	keine	
Champignon	1: 2,5	0,71	keine	dunkelrot
Champignon	1:40	0,04	keine	
Apfel	1: 2,5	0,01	keine	gelblich
Banane (Inneres)	1: 2,5	0,40	keine	fast farblos
Banane (Schale)	1: 2,5	0,15	keine	schwarz

Methode zur Aufnahme einer Aktivierungskurve:

- I. Gewinnung eines Extraktes, der die beiden Komponenten Proenzym und Aktivator enthält:
Bei der Aufarbeitung der Calliphora-Larven waren vor allem 4 Punkte zu berücksichtigen.
1. pH-Abhängigkeit des Aktivierungsvorganges (pH-Optimum bei pH 6,0)
2. Konzentrationsabhängigkeit
3. Temperatur-Abhängigkeit
4. die Inhibitorwirkung von Komponenten der Debrisfraktion.

Folgende Aufarbeitungsmethode wurde entwickelt:

1. Sauber gewaschene Tiere mit einem Frischgewicht von 300-400 mg (durchschnittlich 5-6 Tiere) werden im Normalfall mit genau der 40-fachen Menge Puffer auf 1-2° C gekühlt. Der verwendete Puffer ist 0,065 m wässriger Phosphat-Puffer vom pH 6,0.
2. Es wird 1 min im Potter-Elvehjem-Glashomogenisator homogenisiert. Dabei werden auch die zähen Larvencuticeln fein zerrieben. Das Homogenat erwärmt sich auf 5-6° C. Der Beginn des Homogenisierens ist für die weitere Aufarbeitung und für den Verlauf der Aktivierung der Zeitpunkt 0.
3. 1 min nach Beendigung des Homogenisierens wird in der Servall-Zentrifuge 5 min bei 15 000 UpM (etwa 25 000 g) zentrifugiert. Sofortiges Zentrifugieren ist nötig, um mit der Debrisfraktion die störende Inhibitor-Komponente abzuschleudern. Die Temperatur des Überstandes ist etwa 5-6° C. Er wird in Eiswasser gestellt, wo er sich auf 0° abkühlt.

Die ganze Aufarbeitung wird im Kältelabor bei einer Temperatur von 0-3° C durchgeführt.

II. Verfolgung des Aktivierungsvorganges:

Sofort anschließend an die Aufarbeitung, 10-12 min nach Homogenisieren, wird die erste Messung der Tyrosinase-Aktivität am Photometer Eppendorf durchgeführt. Bei der

gewählten Konzentration (1:40) ist zu diesem Zeitpunkt noch keine oder nur geringe Fermentaktivität im Extrakt festzustellen, der eine Temperatur von 0° hat; d.h. die Aktivierung hat noch nicht eingesetzt. Weitere Messungen werden normalerweise in 5-min-Abständen vorgenommen. Je nach Aktivierungsgeschwindigkeit wird nach 5-10 Messungen eine maximale Fermentaktivität, die Endaktivität, erreicht. Dies ist daraus ersichtlich, daß 2-3 aufeinanderfolgende Extinktionswerte gleich bleiben. Die Meßreihe wird dann beendet.

Trägt man die Werte der gefundenen Tyrosinase-Aktivität mit den dazugehörigen Zeitwerten, beginnend im Zeitpunkt 0, in ein Koordinatensystem ein, so erhält man die gesuchte Aktivierungskurve eines Extrakts.

Aufarbeitung und Messungen am Photometer dauern insgesamt 45 bis etwa 150 min.

III. Genauigkeit des Verfahrens:

Extrakte von Tieren der gleichen Zucht und gleichen physiologischen Alters, die nach dem genannten Verfahren gewonnen worden waren, aktivierten etwa in gleicher Weise, d.h. die Abweichungen zwischen den einzelnen Aktivierungskurven (Endaktivität, Halbaktivierungszeit) waren gering (vergl. Tab. 4).

Gruppe 2	Ansatz Nr.	Endaktivität	Halbaktivierungszeit
	1	0,175	14 min
	2	0,190	17
	3	0,230	17,5
	4	0,205	16
	5	0,220	15,5
	6	0,210	15,5
Mittel ⁺)	M =	0,200	M = 16 min
	σ =	0,017 d.i.	σ = 0,91 d.i.
		8%	6%

$$^+) M = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(x_1 - M)^2 + (x_2 - M)^2 + \dots + (x_n - M)^2}{n-1}}$$

Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert (σ) liegt im allgemeinen unter 10 %. Streuungen von 10-20 % waren an Extrakten von Tieren der Gruppe 1 (Endaktivität) und weißen Vorpuppen (Halbaktivierungszeit) in einigen Fällen zu beobachten.

Beträchtliche Schwankungen der Endaktivität und der Halbaktivierungszeit traten von einer Zucht zur anderen auf:

Gruppe 2; untersuchte Zuchten (n) = 12

Endaktivität M = 0,29, σ = 0,08 d.i. 28 %

Halbakt.Zeit M = 17,0 σ = 2,5 min d.i. 14,7 %

Vergleichende Untersuchungen mußten also innerhalb einer Zucht durchgeführt werden.

Methoden zur Ausschaltung der Ringdrüse:

1. Die Schnürung:

Tiere, deren Kropf möglichst weitgehend entleert ist (ab Gruppe 1 c), werden leicht mit Äther betäubt. Eine Fadenschlinge (dünner Zwirn) wird über das Vorderende der Larven gezogen und etwa zwischen 1. und 2. Körperdrittel, also kurz hinter der Ringdrüse, fest zugezogen. Durch die Ligatur kann das Tier in eine vordere, cephal, Partie getrennt werden, die weiterhin unter dem Einfluß der Ringdrüsen-Hormone steht, und in eine abdominale Partie, deren Versorgung mit diesen Wirkstoffen unterbunden ist.

2. Die Exstirpation nach POSSOMPES:

Bei diesem Verfahren wird die Ringdrüse operativ entfernt. Es weist beträchtliche praktische Schwierigkeiten auf und soll etwas vereinfacht beschrieben werden: Der Eingriff erfolgt unter dem Binokular (25-fache Vergrößerung). Um die Ringdrüse entfernen zu können, muß die Larvencuticula durchschnitten werden (die Tiere sind unter leichter Ätherbetäubung). Dabei drängen sich

normalerweise innere Organe des Tieres, besonders Teile des gelappten Fettkörpers durch die Öffnung nach außen. In der POSSOMPESschen Technik wird diese Hauptkomplika- tion dadurch umgangen, daß Fettkörper, Kropf und ein Groß- teil der Haemolymphe während des Eingriffes vom vorderen Körperdrittel nach hinten verlagert werden und somit nicht stören können (Gummiband, dünne Glasplatte). Gleichzeitig werden dadurch jene vorher vom Fettkörper verdeckten Tra- cheen sichtbar (die feine Cuticula ist bis zum Stadium 4 durchsichtig), an denen sich das Drüsengewebe des Weismann- schen Ringes entlangzieht, das selbst unsichtbar ist (vergl. Abb. 27). Mit einer feinen Schere durchtrennt man die Cuti- cula in einem kurzen waagerechten Schnitt. Die Längstracheen werden etwa in der Mitte gefaßt (Pinzette), etwas angehoben und abgeschnitten, auf der einen Seite kurz vor ihrem Ein- tritt ins Gehirn, auf der anderen Seite etwas nach der kur- zen Quertrachee. Mit dem Tracheendreieck wird die Ringdrüse total entfernt. Nach der Operation sorgt man dafür, daß die nach rückwärts gedrängten inneren Organe wieder ihre norma- le Lage einnehmen.

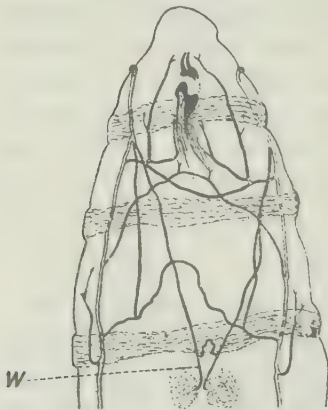


Abb. 27:
Vorderende der Calliphora-
Larve
W Weismannscher Ring
(Tracheendreieck)

3. Die Zerstörung des Weismannschen Ringes in situ nach BURTT - Elektrokauter:

Bei der BURTTschen Methode wird die Ringdrüse nicht entfernt, sondern in situ durch Hitze-Einwirkung zerstört. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Larvencuticula dabei nicht durchschnitten werden muß. Die erwähnten Komplikationen, welche eine operative Entfernung der Ringdrüse so schwierig machen, treten somit nicht auf. Der Eingriff wird unter dem Binokular (25-fache Vergrößerung) durchgeführt.

Das Tier, leicht mit Äther betäubt, wird auf eine Glasplatte mit schwarzem Untergrund gelegt; seine Dorsalseite weist nach oben. Das charakteristische Tracheendreieck, das die Lage der Ringdrüse angibt, wird noch von Teilen des Fettkörpers verdeckt. Übt man nun von oben her mit einer feinen Drahtöse (Durchmesser etwa 2-3 mm), die an einem Halter befestigt ist, einen leichten Druck auf die Cuticula-Partie aus, unter der die Ringdrüse liegen muß, so weichen die Lappen des Fettkörpers und der Kropf zur Seite. Die Ringdrüse wird sichtbar; sie ist im Feld der kleinen Öse dicht unter die Cuticula gepreßt. Die besonders gearbeitete feine Nadelspitze eines Elektrokauters wird dann kurz auf diese Cuticula-Stelle innerhalb der Öse gedrückt. Ein enger Bereich um das Tracheendreieck wird undurchsichtig weiß, die Substanz des Drüsengewebes koaguliert und denaturiert durch örtliches Erhitzen (bis zu 150° C). Nach einiger Übung konnten die Tiere "kauterisiert" werden, ohne daß das dicht an der Ringdrüse liegende Gehirn berührt wurde.

Aktivierung eines Extrakts kauterisierter Tiere nach Zusatz vorgebildeten Aktivators:

Normale nicht kauterisierte Tiere der Gruppe 2-3 wurden mit Phosphat-Puffer pH 6,0 im Verhältnis 1:10 extrahiert. Ebenso wurde aus kauterisierten Tieren ein Extrakt (Konzentration 1:40) gewonnen, der nur mehr zu ganz geringen

Endaktivitäten aktiviert oder ohne Aktivität bleibt.

Zu 9 Teilen Extrakt kauterisierter Tiere wurde 1 Teil des eben aktivierten Extrakts der Normaltiere zugesetzt.

In einer Blindwertsbestimmung wurde 1 Teil Normalextrakt mit 9 Teilen Pufferlösung gemischt.

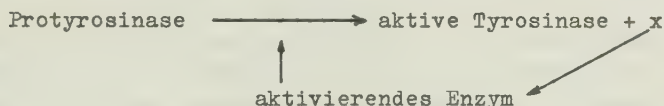
Aktivitätsbestimmungen wurden in kurzen Abständen gemacht.

Injektion des Ecdysons:

Aktive Extrakte bzw. kristallisiertes Hormon wurden so in aqua bidest. gelöst, daß 1 μ l 1 C.E. enthielt. 5 oder 10 μ l (enthaltend 5 oder 10 C.E.) wurde den Tieren mit einer Desaga-Mikroinjektionsspritze seitlich ins Abdomen injiziert. Die Kontrolltiere erhielten 5 oder 10 μ l aqua bidest. allein.

Z U S A M M E N F A S S U N G :

1. Die Tyrosinase liegt bei *Calliphora* in Form eines Pro-enzym vor, das in einem autokatalytischen enzymatischen Prozess aktiviert werden kann. Das Tyrosinase-System läßt sich vereinfacht wie folgt darstellen:



Die Eigenschaften der Protyrosinase, des Aktivators, der aktiven Tyrosinase und eines Inhibitors wurden untersucht; ein Verfahren zur indirekten Bestimmung der Komponenten in Homogenaten ausgearbeitet.

2. Während des späten III. Larvenstadiums von *Calliphora* steigt die meßbare Aktivität von Protyrosinase und Aktivatorenzym in charakteristischer Weise an und erreicht zur Puparisierung hin ein Maximum. Dies läßt auf einen Zusammenhang mit dem Puparisierungshormon Ecdyson schließen.
3. Wird die Ringdrüse (die das Ecdyson bildet) ausgeschaltet, dann sinkt die Wirksamkeit des Aktivatorenzylms bei erwachsenen Larven von *Calliphora*, bis schließlich die Protyrosinase nicht mehr zur Tyrosinase aktiviert wird.
4. Nach Injektion von Ecdyson in ringdrüsenlose Tiere steigt die meßbare Aktivität des aktivierenden Enzyms sehr schnell auf den ursprünglichen Wert an.
5. Die Befunde werden als Beispiel für die Wirkung von Hormonen auf Enzym-System diskutiert.

Verzeichnis der Literatur:

1. Hechter O. Vitamins and Hormones Vol. XIII, 293 (1955)
2. Mueller G.C. et al., Rec. Progr. in Hormone Res. XIV, 95 (1958)
3. Fraenkel G., Proc. Roy. Soc. London Ser. B 118, 1 (1935)
4. Becker E. u. Plagge E., Biol. Zbl. 59, 326 (1939)
5. Vogt M., Biol. Zbl. 63, 395 (1943)
6. Possompes B., Arch. Zool. exp. gener. 89, 204 (1953)
7. Karlson P. u. Hanser G., Z. Naturforsch. 7b, 80 (1952)
8. Karlson P. u. Hanser G., Z. Naturforsch. 8b, 93 (1953)
9. Butenandt A. u. Karlson P., Z. Naturforsch. 9b, 389 (1954)
10. Pryor M.G.M., Proc. Roy. Soc. London Ser. B 128, 378, 393 (1940)
Pryor M.G.M. et al., Biochem. J. 40, 627 (1946)
11. Fraenkel G. u. Rudall K.M., Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 129, 1 (1940)
Fraenkel G. u. Rudall K.M., Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 134, 111 (1947)
12. Dennell R., Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 134, 79, 485 (1947)
13. Hackman R.H., Biochem. J. 54, 362, 367 (1953)
14. Horowitz N.H. u. Fling M., in "Amino Acid Metabolism" (Eds. W. McElroy u. B. Glass, The Johns Hopkins Press, Baltimore 207 (1955))
15. Bodine J.H. et al., J. Cell. Comp. Physiol. 6, 263 (1935)
Bodine J.H. et al., J. Cell. Comp. Physiol. 11, 409 (1938)
Bodine J.H. et al., J. Cell. Comp. Physiol. 12, 71 (1938)
16. Ohnishi E., Japan. J. Zool. 11, 69 (1953)
Ohnishi E., Ann. Zool. Jap. 27, 33 (1954)
Ohnishi E., J. Ins. Physiol. 3, 219 (1959)
17. Dennell R., Proc. Roy. Soc. London Ser. B 136, 94 (1949)
18. Karlson P. u. Schmid H., Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie Bd. 300, 35 (1955)
19. Bertrand G., Compt. rend. 121, 166 (1895)
20. Raper H.S., Biochem. J. 21, 89 (1927)
Raper H.S., Phys. Rev. 8, 245 (1928)
21. Kubowitz F., Biochem. Z. 292, 221 (1937)
Kubowitz F., ibid. 299, 32 (1939)
22. Dawson C.R. u. Nelson J.M., J. Am. Chem. Soc. 60, 250 (1938)

23. Keilin D. u. Mann T., Proc.Roy.Soc. London Ser. B 125,
187 (1938)
24. Mason H.S. et al., J.Am.Chem.Soc. 67, 1233 (1945)
Mason H.S., in Advances in Enzymology XVI 105 (1955)
25. Kertesz A., Nature 179, 1017 (1957)
26. Cromartie R.I.T. u. Harley-Mason J., Biochem.J. 66, 713
(1957)
27. Bu'Lock J. u. Harley-Mason J., J.Chem.Soc. 1951, 703
28. Graubard M., Genetics 27, 199 (1933)
29. Karlson P. u. Wecker E., Hoppe-Seyler's Ztschr.f.physiol.
Chem. Bd. 300, 42 (1955)
30. Thunberg T., Skand.Arch.f.Physiol. Bd. XL, 1 (1920)
31. Lerner A.B., et.al., J.Biol.Chem. 178, 185 (1948)
32. Brown F.C. u. Ward D.N., J.Am.Chem.Soc. 79, 2647 (1957)
33. Ziegler-Günder I. u. Jaenicke L., Z.VererbungsL. 90, 53
(1959)
34. Wigglesworth V.B., Quart.J.Microscop.Sci. 77, 191 (1934)
Wigglesworth V.B., ibid. 79, 91 (1936)
Wigglesworth V.B., J.Exptl.Biol. 29, 561, 620 (1952)
35. Kühn A. u. Piepho H., Biol. Zbl. 58, 12 (1938)
36. Piepho H., Biol. Zbl. 58, 481 (1938)
Piepho H., Biol. Zbl. 59, 314 (1940)
Piepho H., Biol. Zbl. 69, 1261 (1950)
37. Williams C.M., Biol.Bull. 90, 234, 93, 89, 97, 111
(1946-1948)
38. Karlson P., Vitamins and Hormones Vol. XIV, 227
39. Wigglesworth V.B., "The Physiology of Insect Metamorphosis"
(Cambridge Univ.Press London 1954)
40. Knight H.H., Ann.Ent.Soc.Amer. 17, 258 (1924)
41. Piepho H., Z.Tierpsychol. 7, (1950)
42. Caspari E. u. Plagge E., Naturw. 33, 751 (1935)
43. Kaiser P., Roux Arch. 144, (1949)
44. Bückmann D., Biol. Zbl. 72, 276 (1953)
45. Karlson P. u. Bückmann D., Naturwiss. 43, 44 (1956)
46. Piepho H., Arch.Entw.Mech.Org. 141, 500 (1942)
47. Karlson P., Zool.Anz.Suppl. 18, 68 (1955)
48. Weismann A., Z.wiss.Zool. 14, 187 (1865)
49. Artt E.F., Proc.Roy.Soc. London Ser. B 126, 210
(1938)
50. Siekevitz "Regulation of Cell Metabolism" Ciba
Foundation Symp. Ed.Churchill London
1959,
51. Markert C.L., Genetics 35, 60 (1950)
52. Graubard M. u. Nelson J.M., J.Biol.Chem. 111, 757 (1935)

L e b e n s l a u f

Am 1.10.1934 wurde ich als Sohn des damaligen Rektors der Volksschule Weilheim, Anton Schweiger, und seiner Ehefrau Margarete, geb. Gall, in Pähl bei Weilheim/Obb. geboren. Von 1941 - 1945 besuchte ich die Volksschule in Weilheim. Anschließend trat ich in die Oberrealschule der ORG Weilheim ein und legte dort 1954 meine Reifeprüfung ab. Im Winter-Semester 1954/55 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Biologie und Chemie. Im Herbst 1957 konnte ich unter der Anleitung von Dozent Dr. P. Karlson im Max-Planck-Institut für Biochemie in München mit meiner Doktorarbeit beginnen, die nach dem Umzug von Dr. P. Karlson in das Physiologisch-Chemische Institut der Universität dort im Herbst 1959 fertiggestellt wurde.

